

Санкт-Петербургский Государственный университет  
Биологический факультет  
Кафедра генетики и биотехнологии

Юрий Викторович Маловичко

**Локализация рецепторов PXY, CRN и CLV2 в корне редиса  
(*Raphanus sativus* L.)**

---

Выпускная квалификационная работа  
по направлению подготовки 06.04.01 Биология  
основная образовательная программа бакалавриата «Биология»

Научный руководитель:  
доцент СПбГУ,  
к.б.н. Ирина Евгеньевна Додуева

Научный консультант:  
Инженер лаборатории генной и клеточной инженерии  
растений кафедры генетики и биотехнологии СПбГУ  
Александр Анатольевич Ткаченко

---

Санкт-Петербург  
2018

## Оглавление

Введение .....	4
1. Обзор литературы .....	7
1.1. CLE пептиды и их участие в регуляции функционирования меристем высших растений .....	7
1.1.1. Общая характеристика пептидных гормонов растений .....	7
1.1.2. Пептиды CLE: структура и классификация .....	8
1.1.3. Функции пептидов CLE .....	9
1.2. Рецепторы пептидов CLE .....	14
1.2.1. Общая характеристика рецепторов пептидов CLE .....	14
1.2.2. Рецептор TDIF RECEPTOR/PHLOEM INTERCALATED WITH XYLEM (TDR/PXY) .....	15
1.2.3. Мембранные белки CORYNE (CRN) и CLAVATA2 (CLV2) .....	16
1.3. Развитие корнеплода и естественных опухолей у редиса .....	18
1.3.1. Развитие корнеплода редиса .....	18
1.3.2. Опухолеобразование у растений и естественные опухоли редиса .....	21
2. Материалы и методы .....	30
2.1. Растительный материал .....	30
2.2. Подбор праймеров для ПЦР и ОТ-ПЦР в реальном времени .....	30
2.3. Выделение РНК из опухолевого материала и проверка наличия транскриптов при помощи ОТ-ПЦР в реальном времени .....	31
2.4. Выделение геномной ДНК редиса и арабидопсис .....	31
2.5. Амплификация фрагментов геномной ДНК и трансляционное слияние фрагментов .....	32
2.6. Гель-электрофорез и выделение ДНК из агарозного геля .....	33
2.7. Клонирование фрагментов в векторы экспрессии методом GateWay™ .....	33
2.8. Трансформация бактерий Escherichia coli и Agrobacterium rhizogenes .....	34
2.9. Выделение плазмид из бактериальных трансформантов .....	36
2.10. Проверка вставки в вектор при помощи ПЦР, рестрикции и секвенирования по	

Сэнгеру.....	36
2.11. Условия выращивания растений и трансформация при помощи <i>Agrobacterium rhizogenes</i> .....	38
2.12. Приготовление микропрепаратов и конфокальная микроскопия.....	39
2.13. Приготовление препаратов для GUS-окрашивания.....	41
3. Результаты .....	43
3.1. Результаты ОТ-ПЦР и ОТ-ПЦР в реальном времени .....	43
3.2. Амплификация фрагментов ДНК и оптимизация протоколов ПЦР .....	43
3.3. Конструирование векторов экспрессии .....	43
3.4. Получение трансформантов <i>A. rhizogenes</i> .....	45
3.5. Получение растительного материала и растений-трансформантов .....	46
3.5. Проверка успешности трансформации растений при помощи конфокальной микроскопии.....	48
4.6. Анализ трансгенных корнеплодов при помощи флуоресцентной микроскопии.....	50
4.7. GUS-окрашивание.....	50
4. Обсуждения .....	51
4.1. Результаты ОТ-ПЦР в реальном времени.....	51
4.2. Амплификация последовательностей интереса.....	51
4.3. Создание векторов .....	52
4.4. Трансформация растений .....	52
4.5. Выращивание растений в почве и получение опухолей и корнеплодов.....	52
4.6. Гистологический анализ препаратов при помощи флуоресцентной микроскопии....	53
Выводы .....	54
Список литературы.....	55
Приложение 1: Использованные праймеры .....	70
Приложение 2: Протоколы ПЦР .....	71
Приложение 3: Полученные векторы .....	73

## Введение

Морфогенетические процессы в организме растений опосредованы активностью особых тканей, или меристем, состоящих из недифференцированных мультипотентных клеток, способных к пролиферации и последующей дифференциации в клетки любых других тканей организма [Steeves, Sussex, 1989]. Несмотря на то, что подобная организация пролиферирующих тканей значительно отличается от организации пула тканеспецифичных стволовых клеток у животных, регуляция активности и идентичности стволовых клеток у всех многоклеточных организмов демонстрирует ряд общих черт [Doonan, Sablowski, 2010]. Одной из таких черт является участие межклеточного сигналинга, опосредованного как непосредственным контактом экспонированных на поверхности клеток молекул, так и секрецией растворимых агентов в межклеточное пространство. У растений основным механизмом подобных межклеточных взаимодействий является секреция в апопласт или в проводящие ткани специфических сигнальных молекул, или фитогормонов. Сравнительно недавно среди фитогормонов стали выделять отдельную группу низкомолекулярных пептидов, обладающих разнообразными функциями. Данный класс сигнальных молекул подразделяется на две группы: цистеин-богатые пептиды (CRPs) и пептиды, несущие посттрансляционные модификации (PTM peptides) [Czyzewicz et al, 2013]. К последней группе относятся пептиды семейства CLE, участвующие в регуляции активности и поддержания всех имеющихся у растений типов меристем [Kucukoglu, Nilsson, 2015].

Латеральные меристемы (прокамбий и камбий) участвуют в процессах роста аксиальных органов растения в ширину. В онтогенезе подобные процессы подразделяются на первичное и вторичное утолщение, приводящие к появлению первичных и вторичных проводящих тканей, соответственно. У некоторых растений подземные органы в ходе вторичного роста существенно увеличиваются в поперечных размерах и приобретают запасную функцию. В частности, редис (*Raphanus sativus* L. var. *radicola*) из семейства *Brassicaceae* формирует корнеплоды, являющиеся продуктом совместной деятельности камбия в главном корне и нижней части гипокотыля. За счет накопления в корнеплоде ряда веществ, включая углеводы, глюкозинолаты, фолат, аскорбат и различные вторичные метаболиты, редис является важной сельскохозяйственной культурой [Chaturvedi, 2008; Curtis, 2003; Gutiérrez, Perez, 2004].

Помимо конститутивных меристем, таких как апикальные меристемы побега (Shoot Apical Meristem, SAM) и корня (Root Apical Meristem, RAM) и камбий, растения формируют также так называемые нерегулярные меристемы [Dodueva, Frolova, Lutova, 2007]. К результатам

активности данного класса меристем относится широкий круг способных к росту и ограниченной дифференциации объектов, таких как раневые каллусы, продукты деятельности фитопатогенов и естественные опухоли некоторых растительных мутантов и гибридов [Ahuja, 1998; Persinger, Christopher, 1991].

Одним из примеров образования естественных опухолей являются инбредные линии редиса (*Raphanus sativus* L. var. *radicola*), формирующие опухоли на нижней половине корнеплода при переходе к цветению [Pi'ina et al, 2006]. Данные опухоли способны к росту на среде без гормонов, демонстрируют тканевую дифференциацию и слабый вторичный рост. Для опухолей редиса показано наличие собственных очагов меристематической активности, эквивалентных апикальным меристемам и отмеченных экспрессий ряда генов, участвующих в сигнальной системе пептидов CLE [Lebedeva Osipova et al, 2015]. В связи с этим представляется интересным проследить паттерн экспрессии ряда генов, относящихся к пептидному сигналингу, в частности, генов рецепторов пептидов CLE, в опухолевых меристемах.

**Целью** данной работой является выявление локализации рецепторов к пептидам CLE, а именно PXY, CLV2 и CRN, в корнеплоде редиса, а также в спонтанных опухолях у опухолеобразующих линий. Данные рецепторы были выбраны исходя из имеющихся данных об их участии в регуляции работы камбия, за счет активности которого и происходит утолщение корнеплода в ходе его развития.

**Объектом** работы послужил редис инбредных линий 19 и 28 из коллекции кафедры генетики и биотехнологии Санкт-Петербургского государственного университета. Данные линии различаются по признаку опухолеобразования.

В рамках выдвинутой **гипотезы** мы ожидаем обнаружить в корнеплоде паттерн экспрессии генов интереса в камбии, а также в очагах спонтанной меристематической активности, в то время как в опухолях предполагается увидеть менее упорядоченный паттерн из-за слабой гистологической дифференцированности опухолевого материала.

Для успешного достижения сформулированной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Проанализировать литературу по заявленной теме.
2. Убедиться в наличии транскриптов генов интереса в опухолях при помощи ОТ-ПЦР.

3. Амплифицировать необходимые фрагменты генома редиса.
4. Создать репортерные конструкции с использованием GUS и eGFP методом Gateway и клонировать их в векторы экспрессии.
5. Трансформировать бактерии *A. rhizogenes* с использованием полученных векторов.
6. Трансформировать растения редиса двух линий, различающихся по признаку опухолеобразования, с использованием *A. rhizogenes*.
7. Получить трансгенные корнеплоды для обеих исследуемых линий растений и трансгенные опухоли для опухолеобразующей линии
8. Проанализировать паттерн экспрессии репортерных конструкций в трансгенных корнеплодах и опухолях с использованием методов флуоресцентной микроскопии и гистохимии.
9. Сравнить результаты, полученные для корнеплодов и спонтанных опухолей трансгенных растений.

## **1. Обзор литературы**

### **1.1. CLE пептиды и их участие в регуляции функционирования меристем высших растений**

#### **1.1.1. Общая характеристика пептидных гормонов растений**

Пептидные гормоны растений включают большое количество разнообразных по строению и функциям соединений. Наиболее полная классификация растительных пептидов основана прежде всего на природе исходного транслируемого белка [Tavormina et al, 2015]. В соответствии с данной классификацией, пептиды делятся на две крупные группы: проходящие в ходе созревания через этап белка-прекурсора (precursor-derived) и минуящие эту стадию (nonprecursor-derived). Большая часть известных растительных пептидов относится к первой группе; пептиды, не проходящие стадию белка-прекурсора, представлены продуктами трансляции 5'-UTR других белок-кодирующих генов [Arnim Von, Jia, Vaughn, 2014] или 5'-области пре-miRNA [Lauressergues et al, 2015]; кроме того, для некоторых пептидов известны собственные малые открытые рамки считывания в растительных геномах [Andrews, Rothnagel, 2014].

В свою очередь, пептиды, проходящие стадию прекурсора, делятся на две группы в зависимости от наличия у исходного белка собственных функций. К пептидам с функциональными прекурсорами относятся, например, пептид GmSUBPEP сои, являющийся продуктом протеолиза внеклеточной протеазы из семейства субтилизин-подобных протеаз [Pearce et al, 2010]. Наиболее обширной группой растительных пептидов являются пептиды с нефункциональным прекурсором, представленная тремя подгруппами: цистеин-богатые пептиды (cysteine-rich peptides, CRPs), посттрансляционно модифицированные пептиды (post-translationally modified peptides, PTMs) и цистеин-бедные пептиды без посттрансляционных модификаций [Coninck De, Smet De, 2016; Czyzewicz et al, 2013; Tavormina et al, 2015]. Первая группа включает пептиды, содержащие от 2 до 16 остатков цистеина и участвуют преимущественно в антимикробном ответе при поражении растения бактериями [Maróti, Downie, Kondorosi, 2015], а также в ряде физиологических процессов, таких как регуляция активности устьиц [Hara et al, 2007; Sugano et al, 2010], симбиогенетические процессы [Maróti, Downie, Kondorosi, 2015], прорастание пыльцевой трубки [Marshall, Costa, Gutierrez-Marcos, 2011; Qu et al, 2015], активация гамет и развитие семени [Bircheneder, Dresselhaus, 2016]. В свою очередь, ко второй группе относятся четыре

семейства пептидов с разнообразными функциями: CLE, RALF, CEP и RGF/CLEL/GLV, а также несколько малых семейств [Coninck De, Smet De, 2016]. В развитии растения наибольшую роль играет группа пептидов CLE, выступающих в качестве регуляторов активности и идентичности меристем [Cock, McCormick, 2001].

### **1.1.2. Пептиды CLE: структура и классификация**

CLE (от CLV3/EMBRYO SURROUNDING REGION) представляют собой небольшие пептиды длиной 60-120 аминокислотных остатков и массой до 15 kDa [Oelkers et al, 2008]. На С-конце пре-пропептиды CLE несут одну или более копии последовательности из 12-14 аминокислот, называемой также CLE-боксом [Додуева et al, 2012; Kucukoglu, Nilsson, 2015]. В активной форме пептид представлен исключительно CLE-боксом. Помимо этого, пре-пропептид также содержит N-терминальную сигнальную последовательность, регулирующую его процессинг и распределение, и вариабельный домен между сигнальной последовательностью и CLE-боксом [Oelkers et al, 2008].

Как и другие PTMs, пептиды CLE подвергаются посттрансляционным модификациям. На первом этапе происходит гидроксилирование остатков пролина (Pro3 и/или Pro7) до гидроксипролина (Hyp) при участии пролил-4-гидроксилазы, локализованной в мембранах эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи [Gorres, Raines, 2010]. На примере CLV3 показано, что замещение остатков пролина на аланин негативно сказывается на активности CLE [Kondo et al, 2008]. Далее, остаток Hyp7 подвергается гликозилированию путем присоединения до трех остатков L-арабинозы гидроксипролин О-арабинозилтрансферазой в аппарате Гольджи [Ogawa-Ohnishi, Matsubayashi, 2015]. Данная модификация необходима для правильной пространственной организации пептида и взаимодействия с рецептором; при этом а-, моно- или дигликозилированная формы при экзогенном добавлении достигают максимального эффекта при значительно более высоких концентрациях по сравнению с тригликозилированной [Shinohara, Matsubayashi, 2013; Shinohara, Matsubayashi, 2015]. На роль гликозилирования в обеспечении эффективности пептидов CLE указывает то, что мутации по гену О-арабинозилтрансферазы FIN у томата приводит к фенкопии мутации по гену CLV3 [Xu et al, 2015]. В то же время показано, что остатки Hyp не участвуют напрямую в связывании с рецептором; основная функция данной модификации заключается в обеспечении конформации, облегчающей связывание N- и С-концевых остатков с мотивами в составе рецепторного домена, а также, возможно, в повышении растворимости пептида [Goldraij et al, 2006; Zhang et al, 2016a].



Гены CLE-пептидов представлены в геномах надземных растений обширными наборами паралогов: так, у *Arabidopsis thaliana* имеется 32 гена, кодирующих CLE-пептиды [Hastwell, Gresshoff, Ferguson, 2015]. По некоторым данным, количество генов CLE традиционно занижается из-за недостатков работы существующих протоколов аннотации: так, у растений, геномы которых подвергались в ходе эволюции полиплоидизации (картофель, томат, банан) количество генов CLE не слишком велико [Goad, Zhu, Kellogg, 2016; Hastwell, Gresshoff, Ferguson, 2015].

Анализ нуклеотидных последовательностей выявил разделение генов CLE на три эволюционные ветви: к первой относятся гены CLE1-CLE7, ко второй – CLE9-CLE13, к третьей – CLE41-CLE44 [Додуева et al, 2012]. В свою очередь, функционально CLE подразделяются на две группы: представители группы А (AtCLV3, AtCLE40) участвуют преимущественно в подавлении пролиферации клеток апикальных меристем и стимуляции пролиферации клеток латеральных меристем, в то время как пептиды группы В (например, TDIF, AtCLE41, AtCLE44), не имеют ингибиторного эффекта на клетки апикальных меристем [Whitford et al, 2008]. При этом для первой группы клетки-эффекторы представлены нишей стволовых клеток, окруженных переходящим к делению и дифференциации клеток, а для второй – слоями клеток без явного разграничения стволовых клеток в пределах слоя. Тем не менее, пептиды из разных групп могут демонстрировать синергизм в регуляции некоторых процессов, в частности, в развитии проводящих тканей [Whitford et al, 2008]. Альтернативная классификация CLE основана на анализе мутаций приобретения функций (gain-of-function analysis) и содержит три группы, где группы I и II синонимичны группам А и В, соответственно, а группа III включает пептиды CLE1-7 с неустановленными функциями [Mortier et al, 2011]. Последняя классификация, созданная на основании кластерного анализа 1628 аминокислотных последовательностей CLE-домена из 57 организмов, предполагает наличие 3 крупных кластеров, причем группа 1 соответствует группе А и подразделяется на ряд групп более низкого ранга, группа 2 соответствует группе В, а группа 3 включает пептиды, участвующие в установлении симбиоза с почвенными бактериями [Goad, Zhu, Kellogg, 2016].

### 1.1.3. Функции пептидов CLE

Пептиды CLE участвуют в регуляции активности практически всех встречающихся у растений типов меристем. В данном разделе мы остановимся на двух наиболее исследованных моделях CLE-сигналинга: апикальных меристемах корня и побега и латеральных меристемах (прокамбии и камбии).

### 1.1.3.1. Регуляция активности апикальных меристем

Основная функция пептидов CLE – контроль размера меристем за счет регуляции экспрессии генов транскрипционных факторов WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN (WOX) [Matsubayashi, 2014]. Каноническим примером является система CLV3-WUS в апикальной меристеме побега у *Arabidopsis thaliana* [Schoof et al, 2000]. Ген CLV3 экспрессируется в апикальной области SAM; синтезированные пептиды подвергаются процессингу и выходят в апопласт. Достигнув клеток организующего центра (ОЦ, OC), пептиды взаимодействуют с рецепторами плазматической мембраны.

В центральной зоне ОЦ в качестве рецепторов выступают гомодимеры CLAVATA1 (CLV1), RECEPTOR PROTEIN KINASE 2 (RPK2) и ERECTA, а также гетеродимеры CLAVATA2 (CLV2) и CORYNE (CRN) и мультимерные комплексы CLV1/CLV2/CRN; в периферической зоне аналогичную роль выполняют гомодимеры BAM1, гетеродимеры BAM1/RPK2 и CLV2/CRN [Somssich et al, 2016]. Дальнейшая сигнальная трансдукция может идти по двум путям. В случае комплексов, включающих CLV1, CLV2 и CRN, инактивация экспрессии гена WUS происходит за счет репрессии активности фосфатаз POLTERGEIST1 (POL1) и POLTERGEIST-LIKE1 (PLL1) положительных регуляторов экспрессии WUS [Song, Lee, Clark, 2006]. Димеры RPK2, ERECTA, а также мультимеры CLV1/CLV2/CRN, в свою очередь, взаимодействуют с G-белками; в частности, подобный механизм показан для RPK2 [Ishida et al, 2014]. В данном случае в качестве эффектора выступает  $\alpha$ -субъединица, предположительно, запускающая каскад MAP-киназ [Betsuyaku et al, 2011]. Примечательно, что сигналинг через димеры CLV1, напротив, подавляет проведение сигнала по данному пути. Дальнейшая сигнальная трансдукция происходит, предположительно, с участием транскрипционных факторов семейства HD-ZIPIII, активность которых репрессирует экспрессию гена WUS [Chen et al, 2013; Mandel et al, 2016].

Подавление экспрессии генов WUS, а также генов его партнеров, белков HAM1/2, приводит к снижению пролиферативной активности клеток покоящегося центра меристемы (ПЦ, quiescent center, QC) [Zhou et al, 2015]. Показано, что экспрессия WUS приурочена исключительно к OC, однако сам белок способен перемещаться между клетками по системе плазмодесм [Daum et al, 2014; Yadav et al, 2011]. В свою очередь, белки HAM не покидают клетку, однако домен их экспрессии охватывает всю апикальную меристему [Zhou et al, 2015]. Одним из последствий активности данных белков является активация экспрессии CLV3 в апикальной области SAM; таким образом, регуляция активности WUS организована по принципу отрицательной обратной связи [Gaillochet, Daum, Lohmann, 2015].

Сходная система регуляции активности ОС функционирует в апикальной меристеме корня (root apical meristem, RAM) [Perilli, Mambro Di, Sabatini, 2012]. В качестве аналога WUS здесь выступает WOX5 [Stahl et al, 2009], также экспрессирующийся в клубеньках и ряде нерегулярных меристем [Lebedeva Osipova et al, 2015; Osipova et al, 2012], а аналогом CLV3 – пептиды CLE19 и CLE40 [Casamitjana-Martínez et al, 2003; Stahl et al, 2009]. Примечательно, что гены CLE экспрессируются в данном случае не в меристематических клетках, как в случае с SAM, а в уже дифференцированных клетках стелы и/или колумеллы. В отсутствие сигнала CLE наблюдается пролиферация стволовых клеток колумеллы; экспрессия генов CLE19 и CLE40 или экзогенное добавление соответствующих пептидов приводит к уменьшению числа стволовых клеток за счет дифференцировки наиболее дистальных из них [Stahl et al, 2009; Stahl et al, 2013]. В качестве рецепторов CLE в RAM выступают комплексы CLV1/ACR4 (ARABIDOPSIS CRICKLY 4), для которых показано расположение преимущественно в районе плазмодесм [Stahl et al, 2013]. Также было показано наличие ACR4 в мембранах ряда клеток SAM, в частности, всех клеток слоя L1, однако конкретная функция ACR4 в меристемах побега до конца не выяснена [Somssich et al, 2016; Gifford, 2003].

#### **1.1.3.2. Регуляция активности латеральных меристем и развития проводящих тканей**

Среди латеральных меристем наиболее изученным примером регуляции активности системой WOX-CLE является развитие ксилемы из прокамбия и камбия [Etchells et al, 2016]. Основными элементами данной системы являются пептиды CLE, объединяемые под общим названием TDIF (tracheary differentiation inhibitory factor), рецептор PXY/TDR (phloem intercalated with xylem/TDIF receptor) и транскрипционные факторы WOX4 и WOX14.

Фактор TDIF был впервые выделен из культуры клеток циннии в качестве негативного регулятора транс-дифференциации клеток мезофилла в ксилемные элементы и позитивного регулятора клеточной пролиферации [Ito et al, 2006; Qiang et al, 2013]. В качестве гомологов TDIF для *A. thaliana* были обнаружены пептиды AtCLE41 и AtCLE44; кроме того, высокий уровень гомологии с TDIF обнаруживают пептиды AtCLE42 и AtCLE46. Пептиды CLE41 и CLE44 секретируются клетками флоэмы и формируют позиционный сигнал, стимулирующий деление и ингибирующий дифференциацию прилежащих клеток камбия [Suer et al, 2011]. Сверхэкспрессия CLE41 и CLE44 или их экзогенное добавление у *A. thaliana* приводит к расширению прокамбиального слоя в гипокотиле и соцветиях и

нарушению развития проводящих пучков в листьях [Etchells, Turner, 2010; Whitford et al, 2008; Hirakawa et al, 2008]. Сходный эффект на развитие прокамбия имеет ряд пептидов группы А, в частности, CLE6, CLE19 и CLV3 [Whitford et al, 2008]. В частности, сверхэкспрессия гена CLE19 *Brassica napus* (BnCLE19) у арабидопсис приводит к доминированию дифференциации клеток прокамбия над их пролиферацией на ранних этапах развития ксилемы, что приводит к формированию ксилемных островков и нарушению развития органов гинецея; в то же время экзогенное добавление CLE19, CLE6 и CLV3 усиливает эффект TDIF на пролиферацию прокамбиальных клеток [Whitford et al, 2008; Fiers et al, 2004]. Важно также отметить, что функция ортологов TDIF в развитии ксилемы сохраняется у всех растений эуфиллофитной линии эволюции (*Euphyllophyta*), в частности, у голосеменных (*Ginkgo biloba*) и папоротников (*Adiantum aethiopicum*); в то же время, у плаунов (на примере *Selaginella kraussiana*) экзогенное добавления собственного ортолога или TDIF-пептидов арабидопсис никак не сказывается на дифференциации трахеальных элементов [Hirakawa, Bowman, 2015]. Помимо участия в регуляции развития латеральных меристем и проводящих тканей, для CLE41 и CLE42 показано участие в индукции развития пазушных меристем и роста пазушных почек [Yaginuma et al, 2011].

Рецептор TDR/PXY был открыт в ходе скрининга Т-ДНК инсерционных мутантов по генам LRR-RLK [Fisher, Turner, 2007; Hirakawa et al, 2008]. Соответствующие мутанты демонстрируют сниженное количество прокамбиальных клеток из-за преобладания дифференциации ксилемы над клеточным делением; на морфологическом уровне это выглядит как сближение, вплоть до взаимопроникновения, ксилемы и флоэмы (отсюда название PXY – phloem intercalated with xylem). Показано, что TDR/PXY является рецептором для TDIF (в случае арабидопсис – CLE41 и CLE44), а также CLE42, однако не способен связываться с пептидами группы А, в частности, с CLV3, CLE2, CLE9 и CLE19 [Etchells, Turner, 2010; Yaginuma et al, 2011]. Более детальное описание данного рецептора будет дано ниже.

Сигнальная трансдукция TDIF-TDR/PXY включает взаимодействие рецептора TDR и киназ BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 2 (BIN2), BIN2-LIKE 1 (BIL1), BIL2, SHAGGY-RELATED KINASE 11 (ATSK11) и ATSK13 [Etchells et al, 2016]. Вышеприведенные киназы относятся к группе митоген-активируемых киназ Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK3); экспрессия генов данных киназ повышается при наличии TDIF-сигнала [Kondo et al, 2015]. GSK3, в свою очередь, фосфорилируют транскрипционные факторы BRASSINAZOLE-RESISTANT 1 (BZR1) и BRI1-EMS-SUPPRESSOR 1 (BES1), что приводит к их инактивации [Etchells et al, 2016; Kondo et al, 2014]. Интересно, что сигнальный путь брассиностероидов

имеет прямо противоположное влияние на развитие ксилемы: сигнальная трансдукция данных гормонов, опосредованная рецепторами BRASSINOSTEROID INSENSITIVE (BRI), BRI-LIKE1(BRL1) и BRL2, приводит к негативной регуляции активности BIN2, гипофосфорилированию BZR1 и BES1 и, в конечном счете, стимулирует развитие ксилемы [Yamamoto et al, 2001; Yamamoto et al, 2007].

Показано, что программа пролиферации прокамбия/камбия регулируется транскрипционными факторами WOX4 и WOX14 [Hirakawa, Kondo, Fukuda, 2010; Etchells et al, 2013]. Данные транскрипционные факторы демонстрируют функциональную избыточность: одиночные мутанты имеют меньший диаметр аксиальных органов, однако не проявляют характерного для *pxu*-фенотипа сближения ксилемы и флоэмы. С другой стороны, паттерны экспрессии WOX4 и WOX14 несколько различаются; в частности, уровень экспрессии WOX4 не изменяется по всей длине соцветия, в то время как экспрессия WOX14 в соцветии увеличивается примерно в 20 раз в апико-базальном направлении [Etchells et al, 2013].

Интересно, что сигнальный путь WOX4 и WOX14 является относительно независимой от TDIF-TDR сигнальной системой. Так, двойные мутанты *wox4 wox14* демонстрируют нормальный фенотип, близкий к нормальному, в отличие от мутантов *wox4 pxu* или *wox14 pxu* [Etchells et al, 2013]. Кроме того, эффективную пролиферацию клеток прокамбия, опосредованную данными транскрипционными факторами, можно вызвать путем создания локального максимума концентрации ауксина, при этом WOX4 способен положительно регулировать ответ клеток камбия на ауксиновый сигнал [Fisher, Turner, 2007; Suer et al, 2011]. Еще одной точкой пересечения сигнальных путей ауксина и TDIF является формирование боковых корней, в ходе которого повышение концентрации ауксина приводит к дерепрессии генов транскрипционных факторов AUXIN RESPONSE FACTOR 7 (ARF7) и ARF19 со стороны белков AUX/IAA; показано, что TDIF-TDR-зависимая активация BIN2 в точке закладки бокового корня приводит к снижению аффинности взаимодействия между AUX/IAA и ARF и активации соответствующей программы развития [Cho et al, 2013].

Помимо ауксина и брассиностероидов, сигнальный путь TDIF-TDR также пересекается с сигнальными путями этилена и жасмонатов [Etchells et al, 2016]. Показано, что в мутантах *pxu* повышается экспрессия транскрипционных факторов ETHYLENE RESPONSE FACTOR 1 (ERF1), ERF18 и ERF109, корегулируемых этими двумя группами гормонов [Etchells, Provost, Turner, 2012; Cai et al, 2014; Pauwels et al, 2008]. В данном случае ERF формируют компенсаторный механизм, препятствующий преждевременной дифференциации камбия

по пути развития ксилемы. В частности, множественные мутанты по генам ERF и TDIF/TDR/WOX демонстрируют дополнительное уменьшение количества клеток прокамбия и камбия.

## **1.2. Рецепторы пептидов CLE**

### **1.2.1. Общая характеристика рецепторов пептидов CLE**

Рецепторы CLE относятся к трем семействам белков: LRR-RLK, RLP и RLCK, при этом преобладают представители первой группы, в то время как белки из двух других групп выполняют функцию преимущественно корецепторов [Somssich, Bleckmann, Simon, 2016].

Семейство LRR-RLK (Leucine-Rich Repeat Receptor-Like Kinases) представлено трехдоменными белками, внеклеточный домен которых содержит лейцин-богатые повторы (LRR), а цитоплазматический домен обладает серин/треонин-киназной активностью [Shiu, Bleecker, 2001; Liu et al, 2017]. В силу своего широкого спектра действия и часто наблюдаемой функциональной избыточности гены RLK представлены в растительных геномах в большом количестве: так, например, в геноме *Arabidopsis thaliana*, по разным оценкам, имеется от 300 [Arabidopsis Genome Initiative, 2000] до 610 [Shiu, Bleecker, 2001]; в геноме *Solanum lycopersicum* имеется 234 гена, кодирующих RLK [Wei et al, 2015]. Согласно филогенетическим данным, RLK формируют единое монофилетическое семейство, выступающее в качестве сестринской группы по отношению к тирозинкиназам животных [Shiu, Bleecker, 2001]. Внутри семейства выделяется 15 подсемейств с известными филогенетическими связями [Gou et al, 2010]. В аналогичной работе, проведенной для семейства Rosaceae, выделяется уже 23 подсемейства данных рецепторов [Sun et al, 2017].

В ходе эволюции LRR-RLK рецепторы впервые появляются у зеленых водорослей и далее встречаются во всех таксонах *Viridiplantae*, включая мхи, плауны и семенные растения [Liu et al, 2017]. Показано, что гены LRR-RLK сохраняют уникальную интрон-экзонную архитектуру в пределах крупных таксонов; наибольшему эволюционному давлению (оценка через  $dn/ds$  ratio) подвергаются рецепторы к антигенам фитопатогенов и пептидным гормонам [Liu et al, 2017].

Как правило, для осуществления ферментативной функции RLK димеризуются, образуя гомо- или гетеродимеры, а также олигомеры, причем партнёром RLK может являться также белок из другой группы, т.е. RLP или RLCK [Somssich et al, 2016]. Димеризация происходит, как правило, после связывания рецепторов с лигандом и может происходить по одной из трех гипотетических моделей: 1) гетеродимеризации (например, с корецепторами группы SERK) через лиганд по модели «молекулярного клея»; 2) гетеродимеризации за счет аллостерической функции лиганда; 3) гомодимеризации [Song et al, 2017]. Среди гетеродимеров преобладают комплексы рецепторов с сильно разнящимися по размеру внеклеточными доменами; гомодимеры встречаются сравнительно редко и чаще среди белков с короткими внеклеточными доменами [Smakowska-Luzan et al, 2018].

### **1.2.2. Рецептор TDIF RECEPTOR/PHLOEM INTERCALATED WITH XYLEM (TDR/PXY)**

Рецептор TDIF RECEPTOR/PHLOEM INTERCALATED WITH XYLEM (TDR/PXY) локализуется преимущественно в латеральных меристемах и отвечает за поддержание клеток в недифференцированном состоянии [Fisher, Turner, 2007]. Он является компонентом сигнальной системы, включающей также сигнал TDIF, представляющий собой комбинацию пептидов CLE41, CLE42 и CLE44, а также транскрипционные факторы WOX4 и WOX14 [Etchells et al, 2016]. Мутанты *pхy* имеют уменьшенное по сравнению с диким типом количество клеток камбия, так что во многих участках происходит соприкосновение или взаимопроникновение клеток ксилемы и флоэмы. Кроме того, мутанты демонстрируют нарушения организации первичных проводящих пучков в черешках листьев, нарушение упорядоченной ориентации элементов ксилемы, нарушенный вторичный рост и меньшую высоту стебля по сравнению с диким типом [Etchells, Turner, 2010].

С точки зрения существующей классификации LRR-RLK PXY относится к наиболее обширному подсемейству XI, включающему большую часть рецепторов пептидных гормонов [Liu et al, 2017]. Рецепторный домен PXY состоит из 22 LRR, образующих суперспиральную структуру; внутренняя сторона данной структуры содержит рецепторную бороздку, в которой крайние аминокислотные остатки заряжены положительно, а центральные – отрицательно [Zhang et al, 2016a]. Лиганд, имеющий  $\Omega$ -подобную пространственную структуру, взаимодействует своими N-концевыми остатками с петлями, образующимися между  $\beta$ -слоями в LRR4-9, в то время как C-концевые остатки взаимодействуют с остатками в составе  $\beta$ -слоев на внутренней поверхности рецепторного

домена. По данным мутационного анализа, наиболее существенными парами взаимодействующих аминокислотных остатков в паре PXY-TDIF являются PXY<sup>Gly186</sup>/PXY<sup>Gly210</sup>-TDIF<sup>Val3</sup> и PXY<sup>Arg421</sup>/PXY<sup>Arg423</sup>; последнее согласуется с тем, что для обеспечения рецепторной функции представителей подсемейства XI особенно важен консервативный мотив Arg-x-Arg, где x – любая аминокислота [Song et al, 2016].

В качестве корепцепторов для PXY выступают представители семейства SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASES (SERK) [Zhang et al, 2016b]. Данные белки вовлечены в широкий круг биологических процессов: в частности, у арабидопсис все представители данного семейства (SERK1-5) выступают в качестве корепцепторов для рецептора брассиностероидов BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1 (BRI1) [Gou et al, 2012]; SERK1 и SERK2 участвуют в регуляции развития мужского гаметофита [Li et al, 2017]; BAK1/SERK3 взаимодействует с рецепторами PRR (pattern recognition receptors), ответственными за рецепцию патоген-ассоциированных молекулярных паттернов [Chinchilla et al, 2007]. Показано, что SERK1, SERK2 BAK1/SERK3 образуют с PXY гетеродимеры по т.н. механизму «молекулярного клея» (molecular glue), т.е. димеризация происходит после связывания лиганда одним из компонентов димера и поддерживается за счет взаимодействия обоих мономеров с разными функциональными доменами лиганда [Song et al, 2017; Zhang et al, 2016b]. Помимо этого, рецепторы в составе димера также взаимодействуют напрямую через ван-дер-ваальсовы взаимодействия (в частности, в димере SERK2-PXY за подобные взаимодействия отвечает Phe64 со стороны SERK2 и LRR16-18 со стороны PXY) и водородные связи между аминокислотными остатками в составе внеклеточных доменов [Zhang et al, 2016b]. Стоит также отметить, что множественные мутанты по генам SERK (например, *serk1 serk2 bak1*) демонстрируют сниженную чувствительность по отношению к экзогенному TDIF и нарушения развития прокамбия [Zhang et al, 2016b].

### 1.2.3. Мембранные белки CORYNE (CRN) и CLAVATA2 (CLV2)

Белки CORYNE (CRN) и CLAVATA2 (CLV2) чаще всего функционируют в виде димеров или олигомеров вместе с другими рецепторами пептидных гормонов, поэтому имеет смысл рассмотреть их в одном разделе.



Белок CRN (альтернативное название — SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF LLP2, SOL2) относится к группе RLCK: он имеет цитоплазматический киназный, но не имеет внеклеточного рецепторного домена; более того, за счет двух аминокислотных замен (потеря консервативных остатков Asp в HDR-мотиве и Gly в G-петле) в цитоплазматическом домене, а также нарушения последовательности Mg-домена он не способен к автофосфорилированию, т.е. является псевдокиназой [Nimchuk, Tarr, Meyerowitz, 2011; Miwa et al, 2008]. Тем не менее, цитоплазматический домен CRN имеет сайт фосфорилирования в позиции S156 [Zulawski, Braginets, Schulze, 2013], который иногда обозначается как S131, так как альтернативная модель белка содержит информацию об укороченной сплайсоформе [Muller, Bleckmann, Simon, 2008].

*In vivo* CRN формирует димеры с CLV2 или входит в состав мультимеров вместе с CLV1 и CLV2 за счет взаимодействия трансмембранных доменов, при этом димеры CRN/CLV2 в SAM экспрессируются как в центральной, так и в периферической зоне и, по-видимому, участвуют сразу в нескольких сигнальных путях [Somssich, Bleckmann, Simon, 2016]. Исследования локализации CRN и влияния мутаций по данному гену на фенотип растения и распределение в мембране партнеров CRN предполагает, что CRN может выступать в роли скэффолд-белка, организующего рецепторные комплексы в мембране, при этом участие CRN в белок-белковых взаимодействиях, предположительно, осуществляется за счет короткого внеклеточного домена [Somssich, Bleckmann, Simon, 2016]. Данные, полученные путем микроскопии в реальном времени, указывают на формирование олигомерных комплексов CLV1/CLV2/CRN в плазматической мембране еще до связывания сигнального пептида CLV3 [Somssich et al, 2015]; предполагается, что функция CRN заключается не только в обеспечении правильной доставки мембранных белков и сборки комплексов на поверхности мембраны, но и в обеспечении интернализации рецепторных олигомеров. CRN также выступает в качестве позитивного регулятора экспрессии гена RLK BARELY ANYMERISTEM 3 (BAM3), являющегося рецептором к CLE45 в регуляции развития протофлоэмы [Hazak et al, 2017].

Белок CLV2 относится к группе RLP, т.е. рецептороподобным белкам, не имеющим киназной активности [Pan et al, 2016]. Как было отмечено выше, CLV2 входит в состав димеров с CRN, а также в состав мультимеров CLV1/CLV2/CRN. Первоначально CLV2 был открыт как один из участников сигнального пути WUS-CLV3 в апикальной меристеме; показано, что мутанты *clv2* демонстрировали фенотип, аналогичный фенотипам *clv1* и *clv3*, хотя и более слабо выраженный [Clark, Running, Meyerowitz, 1995; Clark, Running,

Meyerowitz, 1993], при этом происходит расширение домена экспрессии CLV1 [Kayes, Clark, 1998]. Фенотип *clv2* наиболее полно проявляется при выращивании в условиях постоянного освещения, однако подавляется в условиях короткого дня; кроме того, мутации CLV2 имеют плейотропный эффект на развитие генеративных органов [Kayes, Clark, 1998].

В апикальных меристемах димеры CLV2-CRN участвуют в поддержании идентичности как центрального, так и периферического доменов, причем, предположительно, независимо от соответствующих магистральных путей сигналинга [Somssich, Bleckmann, Simon, 2016; Guo et al, 2010]. Кроме того, предполагается, что подобные димеры могут негативно регулировать формирование протоксилемы за счет CLE10-зависимого подавления экспрессии ARR5 и ARR6, что приводит к повышению чувствительности клеток к цитокинину [Kondo et al, 2011]. Мутанты по *clv2* и *crn*, как и мутанты *clv1*, демонстрируют эктопическое образование флоральных меристем и плодов [Durbak, Tax, 2011].

Помимо участия в росте и морфогенезе, белки CRN и CLV2 участвуют во взаимодействии растений с патогенами из самых различных таксономических групп. Мутанты *clv1*, *clv2* и *crn* демонстрируют повышенную устойчивость к поражению бактерией *Ralstonia solanacearum* и оомицетом *Hyaloperonospora arabidopsidis* [Hanemian et al, 2016]. Кроме того, комплексы этих рецепторов связывают CLE-подобные пептиды, продуцируемые рядом фитонематод [Replogle et al, 2011].

### **1.3. Развитие корнеплода и естественных опухолей у редиса**

#### **1.3.1. Развитие корнеплода редиса**

Редис посевной (*Raphanus sativus* L;  $2n = 18$ ) — хозяйственно важный представитель семейства Капустные (*Brassicaceae*, в старой нотации — *Cruciferae*) [Tsuro et al, 2008]. Особую хозяйственную ценность представляет корнеплод редиса, в развитии которого участвуют гипокотиль и верхняя часть главного корня растения; примечательно, что для дикого редиса (*Raphanus raphanistrum*), ближайшего родственника редиса посевного, образование корнеплода нехарактерно [Moghe et al, 2014]. Данная часть растения активно используется в пищу в разных регионах мира и представляет особый диетологический интерес за счет высокого содержания углеводов, аскорбата, фолата, сульфорафана и некоторых других соединений [Chaturvedi, 2008].

Морфогенез корнеплода редиса хорошо изучен с точки зрения анатомии и физиологии. Утолщение формирующих корнеплод органов происходит за счет деления клеток паренхимы и экспансии камбия; далее, в результате деления и дифференцировки камбиальных клеток формируется широкий слой вторичной ксилемы и чуть более широкий по сравнению с вышележащей частью гипокотилия слой вторичной флоэмы [Tsuro et al, 2008; Yu et al, 2016]. Одним из признаков перехода растения к формированию корнеплода является деформация коры под действием деления клеток стелы [Wang et al, 2012]. В соответствии с этим в развитии корнеплода иногда выделяют три стадии: стадию, предшествующую деформации коры (pre-cortex splitting stage, L1), стадию деформации коры (cortex splitting stage, L2) и стадию утолщения (expanding stage, L3) [Wang et al, 2012; Yu et al, 2016].

Показано, что в развитии корнеплода участвуют различные группы фитогормонов. В частности, к расширению камбия приводит комплексное действие ауксинов и цитокининов с миоинозитолом, при этом по отдельности эти гормоны не обладают соответствующим эффектом [Loomis, Torrey, 1964]; сходное действие оказывает одновременное добавление ауксина и гиббереллина [Ting, Wren, 1980]. Кроме того, удаление верхней части стебля приводит к инактивации развития корнеплода, что может говорить об участии в данном процессе факторов, выделяемых надземными органами [Ting, Wren, 1980]. Транскриптомные исследования показали, что на стадиях L2 и L3 повышается экспрессия генов транскрипционных фактор ARF, выполняющих функцию активаторов экспрессии ауксин-регулируемых генов, в то время как экспрессия генов репрессоров ответа на ауксин, Aux/IAA, напротив, снижается [Yu et al, 2016]. На стадии утолщения корнеплода происходит также увеличение экспрессии ауксин-зависимых генов SMALL AUXIN UP RNA (SAUR) [Yu et al, 2016], для двух из которых (AtSAUR19 и AtSAUR63) было показано участие в активации роста клеток растяжением в ответ на ауксиновый сигнал у арабидопсис [Kong et al, 2013].

Отдельная роль в развитии корнеплода редиса отводится цитокининам [Loomis, Torrey, 1964; Ting, Wren, 1980]. На стадии L1 происходит повышение концентрации цитокинина и экспрессии соответствующих генов (в частности, генов биосинтеза триптофана и зеатина) L1 [Sun et al, 2015; Yu et al, 2016]. На стадиях L2 и L3, в свою очередь, повышается экспрессия генов ARABIDOPSIS RESPONSE FACTORS (ARF) А-типа, являющихся генами раннего ответа на цитокинин и одновременно негативными регуляторами экспрессии цитокинин-зависимых генов [Kiba et al, 2003]. О влиянии цитокининов на вторичное утолщение корнеплода говорит также корреляция между чувствительностью к цитокинину, толщиной корнеплода и экспрессией ряда генов транскрипционных факторов у разных

инбредных линий редиса [Jang et al, 2015]. Кроме того, подобное влияние цитокинина на развитие запасающего корня наблюдается у маниока (*Manihot esculenta*) [Melis, Staden van, 1985].

Пролиферация и рост камбиальных клеток регулируется рядом транскрипционных факторов. Для редиса на стадии утолщения корнеплода показано увеличение экспрессии в клетках камбия генов транскрипционных факторов, принадлежащих к семействам MADS (MCM1 AGAMOUS DEFICIENS SRF), MYB (MYELOBLASTOSIS), NAC (NAM/ATAF1-2/CUC2), GRAS (GA1/RGA/SCAECROW), AP2 (APETALA2), ERF (ETHYLENE RESPONSE FACTOR), WRKY и KNOX (KNAT-LIKE HOMEODOMAIN) [Jang et al, 2015; Yu et al, 2016]. Участие MADS в развитии подземных запасающих органов известно для таких растений, как маниок (*Manihot esculenta*) [Yao et al, 2013] и батат (*Ipomoea batatas*) [Ku et al, 2008; You et al, 2003]. Транскрипционные факторы из семейств MYB и NAC участвуют в контроле синтеза вторичной клеточной стенки [Zhong et al, 2011; Zhong, Richardson, Ye, 2007], помимо этого, белки NAC задействованы в развитии вторичной ксилемы [Ohashi-Ito, Oda, Fukuda, 2010] и переходе клеток от роста растяжением к делению [Sablowski, Meyerowitz, 1998]. Примечательно, что среди транскрипционных факторов, гены которых повышают экспрессию в камбии (преимущественно на ранних этапах его развития) присутствуют регуляторы активности SAM, такие как SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP, семейство MADS), KNOTTED-LIKE FROM ARABIDOPSIS THALIANA 1 (KNAT1, семейство KNOX) и AINTEGUMENTA (ANT, семейство AP2) [Jang et al, 2015; Liebsch et al, 2014; Melzer et al, 2008].

В свете темы данной работы хотелось бы отдельно остановиться на участии пептидов CLE в развитии корнеплода. На данный момент для редиса идентифицировано 18 генов CLE, среди которых некоторые (например, RsCLE2, RsCLE19, RsCLE41) демонстрируют тканеспецифичный паттерн экспрессии, в то время как другие экспрессируются в различных тканях корня (RsCLE1, RsCLE11, RsCLE13, RsCLE16) [Gancheva et al, 2016]. Переход к формированию корнеплода (стадии L1-L2) сопровождается увеличением уровня экспрессии RsCLE19 и RsCLE41, несущих антагонистические функции: RsCLE41 выступает в роли TDIF-фактора (см. выше) и отвечает за пролиферацию и сохранение меристематического статуса клетками камбия, в то время как RsCLE19 способствует дифференцировке клеток камбия в клетки флоэмы. Уровень экспрессии RsCLE19 существенно повышается при обработке растений экзогенным ауксином и падает при обработке цитокинином; таким образом, повышение концентрации цитокинина приводит к

доминированию пролиферации камбия над дифференцировкой ксилемы [Gancheva et al, 2016].

### **1.3.2. Опухолеобразование у растений и естественные опухоли редиса**

#### **1.3.2.1 Определение и классификация опухолей растений**

В основе регуляции клеточного цикла растительных клеток лежит системный контроль со стороны различных сигнальных систем [Dodueva, Frolova, Lutova, 2007]. Как правило, высокая пролиферативная активность является признаком недифференцированных меристематических клеток, в то время как рост растяжением характерен для зрелых дифференцированных клеток. В случае нарушения внешнего контроля или внутренних сбоев регуляции клеточного цикла клетка может изменить свой пролиферативный статус; в случае приобретения клеткой способности к делению возникает эктопический очаг меристематической активности, приводящий к появлению новообразований [Dodueva, Frolova, Lutova, 2007].

Существуют определенные сложности в терминологии и классификации растительных новообразований. Существует термин «каллус», описывающий недифференцированную массу клеток, способную дать начало целому растению [Dodueva et al, 2016]. Исходно этот термин использовался применительно к клеточным массам, возникающим путем деления ближайших живых клеток на поверхности поранения; подобные образования характеризуются накоплением каллозы [Ikeuchi, Sugimoto, Iwase, 2013]. В настоящее время данный тип новообразований принято называть раневыми каллусами, а исходный термин используется для обозначения любой недифференцированной массы клеток. В свою очередь, опухолями принято называть слабо дифференцированные новообразования, несущие следы вторичной дифференцировки и способные к гормон-независимому росту при эксплантации; им противопоставляются галлы — новообразования, сложенные преимущественно из дифференцированных тканей, обладающие ограниченным пролиферативным потенциалом и неспособные к самоподдержанию на культуральных средах [Gancheva et al, 2016; Dodueva, Frolova, Lutova, 2007]. Кроме того, в англоязычной литературе в качестве синонима для слова «опухоль» (а иногда для и обозначения любого растительного новообразования) используют термин „neoplasm“ [Rasch, Swift, Klein, 1959].

### 1.3.2.2. Каллусы

Так как обзор механизмов каллусообразования и лабораторного использования каллусов является отдельной обширной темой, позволим себе кратко остановиться на основных моментах. Растительные каллусы, в зависимости от их морфологии и степени дифференцировки, делят на четыре класса: компактные недифференцированные; корнееобразующие (rooty calli); побегообразующие (shooty calli); эмбриогенные (embryonic calli) [Frank et al, 2000; Jiang et al, 2015]. Альтернативная классификация основывается на происхождении каллуса и предполагает две основных группы: гормон-индуцированные каллусы, получаемые *in vitro*, и раневые каллусы, возникающие при поранении [Ikeuchi, Sugimoto, Iwase, 2013]. Показано, что первые в своем развитии повторяют программу развития примордия бокового корня (lateral root primordium, LRP), причем вне зависимости от того, из какого органа был взят эксплант [Sugimoto, Jiao, Meyerowitz, 2010]. На это указывают экспрессия в гормон-индуцированных каллусах гена WOX5 (см. выше) и схожий с кончиком бокового корня транскриптомный профиль; кроме того, мутация по гену ABERRANT LATERAL ROOT FORMATION 4 (ALF4) препятствует развитию подобных каллусов [Sugimoto, Jiao, Meyerowitz, 2010]. Развитие подобных каллусов связывают с активностью перицикла, имеющегося как в корне, так и в стебле [Dodueva et al, 2016; Ikeuchi, Sugimoto, Iwase, 2013]. Раневые каллусы, напротив, возникают путем дедифференцировки прилегающих к месту поранения клеток за счет активации экспрессии генов таких транскрипционных факторов, как WOUND INDUCED DEDIFFERENTIATION 1 (WIND1) [Iwase et al, 2011], E2 RELATED FACTOR (E2F) и DIMERIZATION PARTNER (DP) [Kosugi, Ohashi, 2003], LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN 18/33 (LBD18/33) [Berckmans et al, 2011] и ARF7/ARF19 [Okushima et al, 2007]. Кроме того, на каллусообразование влияет уровень экспрессии ингибиторов циклин-зависимых киназ (CDK) KIP-RELATED PROTEIN (KRP); в частности, мутанты по гену PROPORZ1 (PRZ1) демонстрируют спонтанное каллусообразование при сниженном уровне экспрессии генов KRP [Sieberer et al, 2003].

### 1.3.3.3. Индуцированные опухоли растений

Опухоли растений подразделяют на индуцированные и генетические (естественные, или спонтанные) [Dodueva, Frolova, Lutova, 2007]. В соответствии с указанной выше классификацией, естественные опухоли относят к опухолям *sensu stricto*, в то время как

индуцированные опухоли чаще всего (хотя и не всегда) являются ограниченно растущими галлами [Dodueva et al, 2016]. Общим для обоих типов образований являются увеличение размеров (гипертрофия) и количества (гиперплазия) клеток.

Способностью к индукции опухолеобразования обладают патогены из разных систематических групп, включая вирусы, бактерии, грибы, грибоподобных протистов, членистоногих и нематодов [Doonan, Sablowski, 2010]. Наиболее изученным примером индуцированного опухолеобразования являются бактерии из рода *Agrobacterium*, или агробактерии (*Proteobacteria:α-Proteobacteria*; согласно последним данным, агробактерии относятся к роду *Rhizobium* и некоторым другим, однако использование прежних названий допускается [Young et al, 2003]). Агробактерии впервые были открыты в качестве возбудителей заболевания двудольных растений, известного как корончатый галл [Smith, Townsend, 1907]. Соответствующий вид бактерий был первоначально назван *Bacterium tumefaciens*; на данный момент он известен как *Agrobacterium tumefaciens*. Впоследствии были открыты другие представители данного рода, наиболее примечательным из которых является *Agrobacterium rhizogenes*, возбудитель бородатости корней [Ron et al, 2014]. Агробактерии инфицируют растения в области поранений подземной части растения; в качестве аттрактантов со стороны растения при этом выступают различные фенольные соединения, прежде всего ацетосирингон и гидроксиацетосирингон [Brencic, Eberhard, Winans, 2004]. Было показано, что агробактерии необходимы для индукции формирования новообразований, однако для дальнейшего роста их присутствие не обязательно; более того, опухолевые экспланты оказались способными к гормон-независимому росту на культуральных средах без ауксина и цитокинина [Nester, 2015]. Это позволило предположить, что бактерии каким-то образом модифицируют пораженные клетки вместо того, чтобы постоянно выделять в окружающее пространство опухолеобразующие факторы. Долгое время природа модифицирующего фактора оставалась неизвестной, однако было продемонстрировано, что он может передаваться от патогенных штаммов к непатогенным, подобно плазмидам [Kerr, 1969]. Как выяснилось в дальнейшем, этим фактором действительно являются мегаплазмиды массой от 96 до 156 Mda [Zaenen et al, 1974]. Как будет показано ниже, агробактерий можно назвать настоящими генетическими паразитами, использующими внедрение собственной ДНК для изменения клеточного цикла и метаболизма пораженных хозяйских клеток.

Мегаплазмиды агробактерий (Ti, от tumor inducing, у *A. tumefaciens*; Ri, от root inducing, у *A. rhizogenes*) составляют в длину примерно 200 kbs [Gordon, Christie, 2014]. Репликация и распределение данных плазмид обеспечивается *repABC*-системой [Tabata, Nooykaas, Oka,

1989]. Данная система включает белок RepC, позитивно регулирующий репликацию плазмиды; антисмысловую РНК RepE, подавляющую экспрессию гена *repC* с увеличением копийности плазмиды; белки RepA и RepB, участвующие в расхождении плазмид при делении клетки [Pinto, Pappas, Winans, 2012]. Данная система позволяет поддерживать низкое число копий плазмиды (~1 на клетку в отсутствие контакта с растением).

Основными локусами, участвующими непосредственно в генетической колонизации растения, являются T-ДНК и *vir* [Gordon, Christie, 2014]. T-ДНК представляет собой полигенный участок, фланкированный двумя повторами; к правому повтору примыкает последовательность, получившая название „overdrive sequence“ и необходимая для правильной эксцизии и транспорта T-DNA [Toro et al, 1988]. Гены в составе T-ДНК делятся на две группы. Гены первой группы участвуют в синтезе особой группы вторичных аминов — опинов, - которые используются бактериями в качестве источника углерода [Johnson et al, 1974; Ron et al, 2014; Seitz, Hochster, 1964]. Опины не утилизируются растением и вместо это секретируются в заселяемые агробактериями ниши. В свою очередь, у самих агробактерий в составе вирулентных плазмид имеются гены, отвечающие за расщепление и дальнейшую утилизацию опинов в цитоплазме [Zhu et al, 2000]. Вторая группа генов кодирует белки, участвующие в изменении гормонального баланса в опухолевых клетках. В случае Ti-плазмид это гены, участвующие в синтезе гормонов: гены синтеза ауксина TUMOR MORPHOLOGY SHOOTY 1/2 (*tms1/2*; альтернативные названия — *iaaM/iaaH*), кодирующие триптофан монооксигеназу и индолацетамид гидролазу, соответственно; ген синтеза изопентениладениновых цитокининов TUMOR MORPHOLOGY ROOTY (*tmr*; альтернативное название — *ipt*), кодирующий изопентенил трансферазу; TUMOR MORPHOLOGY LARGE (*tml*), продукт которого повышает чувствительность опухолевых клеток к фитогормонам [Nester, 2015]. В состав T-ДНК Ri-плазмид входят гены, продукты которых не участвуют в синтезе фитогормонов, однако повышают чувствительность инфицированных клеток к текущему гормональному фону [Stieger et al, 2004]. Кроме того, для многих генов в составе T-ДНК конкретная функция неизвестна; показано, однако, что транскрипты некоторых из них не транслируются, а подвергаются процессингу, продукты которого мимикрируют под хозяйские мРНК [Peláez et al, 2017].

Локус *vir* не переносится в растительную клетку, однако непосредственно участвует в генетической колонизации. Гены в составе *vir*-локуса кодируют белки, участвующие в прохождении основных этапов агробактериальной инфекции. Ген *virA* кодирует мембранный рецептор с Нус-киназной активностью; показано, что данный белок работает в форме димера и является рецептором, с одной стороны, к растительным аттрактантам, с



другой — к сахарам в периплазматическом компартменте [Cangelosi, Ankenbauer, Nester, 1990; Leroux et al, 1987; Pan et al, 1993]. VirA фосфорилирует транскрипционный активатор VirG, который позитивно регулирует экспрессию остальных генов *vir*-оперона [Melchers et al, 1989]. Далее эндонуклеаза VirD2 вносит разрывы по фланкирующим Т-ДНК повторам и связывается с 5'-концом одной из цепочек ДНК; в обеспечении ее функционирования участвуют белок VirC1, связывающийся с *overdrive sequence* [Herrera-Estrella et al, 1988; Toro et al, 1989]. Далее, с Т-ДНК связывается комплекс из SSB-подобного белка VirE2 и шаперона VirE1 [Sen et al, 1989; Zhao et al, 2001]. Предполагается также, что VirE2 участвует в транспорте комплекса одноцепочечной Т-ДНК с белками в ядро растительной клетки [Bhattacharjee et al, 2008]. Данный комплекс выводится из клетки бактерии через секреторную систему IV типа, состоящую из 11 белков группы VirB [Nester, 2015]. Помимо этого, в локусе *vir* имеются гены белков VirH (P450-подобные монооксигеназы), VirF (протеаза, участвующая в созревании VirE и некоторых других белков), VirE3 (VIP1-подобный белок), VirD5 (белок, препятствующий убиквитинилированию VirF в цитоплазме растительной клетки), VirJ (белок с неизвестной функцией и HspL (шаперон, ассоциированный с B8-субъединицей секреторного комплекса), наличие функциональных копий которых не является критичным для прохождения трансформации [Gordon, Christie, 2014; Nester, 2015]. Связываясь с белками импортинами и попадая в ядро клетки (предположительно, за счет активности VIP1, хотя в некоторых случаях его наличие не является критичным [Gordon, Christie, 2014]), Т-ДНК встраивается в хозяйский геном. Номинально этот процесс происходит случайно, однако имеются данные о том, что чаще всего инсерция происходит в транскрибируемые, промоторные или А/Т-богатые участки [Sallaud et al, 2004; Schneeberger et al, 2005]. Встроившаяся Т-ДНК экспрессируется в хозяйской клетке и наследуется ее потомками при переходе клеток опухоли к делению.

Еще одним примером генетических паразитов растений, способных вызывать опухолеобразование, являются вирусы из семейства *Geminiviridae* [Latham et al, 1997; Park et al, 2004]. Геминивирусы относятся к двухцепочечным ДНК-вирусам. В отличие от остальных описанных здесь патогенов, данные вирусы вызывают опухоли не за счет модулирования гормонального фона, а путем прямого вмешательства в клеточный цикл [Doonan, Sablowski, 2010]. В основе данного механизма лежит подавление активности белков RETINOBLASTOMA RELATED (RBR) — ключевых негативных регуляторов G1/S-перехода в клетках. Показано, что белки RBR в растениях способны связывать транскрипционные факторы E2F (см. выше) [Lammens et al, 2009]. Вирусный белок Rep, взаимодействуя с RBR, высвобождает E2F, которые, димеризуясь с белками DP, запускают

G1/S-переход в инфицированных клетках и их дальнейшую пролиферацию [Desvoyes et al, 2005; Gutierrez, 2000]. В то же время вирус курчавости листьев капусты (cabbage leaf curl virus, CaLCV) вызывает полиплоидизацию клеток за счет стимуляции эндомитозов (переход G1/S) и подавления карио- и цитокинеза (переход G2/M) [Ascencio-Ibanez et al, 2008].

В отличие от генетических паразитов, эукариотические фитопатогены вызывают опухолообразование за счет секреции белков или готовых фитогормонов. В частности, подобную тактику используют амебоидные протисты *Plasmodiophora brassicae* (Plasmodiophorales) [Devos et al, 2005], грибы *Ustilago esculenta* (Ustilaginales), *Taphrina deformans* (Taphrinales) и *Dibotryon morbosum* (Pleosporales) [Chung, Tzeng, 2004; Fernando et al, 2005; Tavares et al, 2004]. Для плазмодиофор показано изменение концентрации ауксинов, цитокининов и брассиностероидов, однако конкретный механизм этих изменений остается неизвестным, хотя есть мнение, что минорное количество необходимых для гомеостаза опухоли цитокининов выделяется самим протистом [Malinowski et al, 2016; Schuller, Kehr, Ludwig-Müller, 2014; Schwelm et al, 2018]. Для паразитических грибов, напротив продемонстрирована способность к синтезу фитогормонов. Например, *Ustilago esculenta* способен к синтезу индолацетата из индол-3-ацетамида, индолпирувата и индоллактата [Chung, Tzeng, 2004]. У *Taphrina deformans* открыта способность к декарбоксилированию триптофана до триптамина, а также обнаружены гены, ответственные за последующие этапы синтеза ауксина и его дальнейший экспорт [Cissé et al, 2013; Perley, Stowe, 1966].

Среди насекомых способность к галлообразованию характерна для представителей отрядов *Hymenoptera*, *Hemiptera* и *Diptera* [Dodueva, Frolova, Lutova, 2007]. Подобные опухоли имеют вид классических галлов и обладают ограниченной способностью к росту. Тем не менее, конкретные механизмы галлообразования были показаны для ограниченного количества видов. Так, например, *Pachypsylla celtidis-mamma* (Hemiptera: Psyllidae) образует галлы, в которых концентрация изопентениладенозина повышена в 50 раз по сравнению с прилежащими тканями [McDermott, Meilan, Thornburg, 1996]. Личинки мух *Eurosta solidaginis* (Diptera: Tephritidae) способны синтезировать цитокинины и секретировать их вместе со слюной [Mapes, Davies, 2001]. Примечательно, что для насекомых характерен синтез специфических медиаторов, вызывающих опухолообразование у растений. Примером таких соединений являются алифатические диолы брухины, выделяемые имаго долгоносиков из рода *Bruchus* (Coleoptera: Curculionidae) при откладке яиц [Doss et al, 2000].

Отдельно стоит рассмотреть механизмы, используемые галлообразующими нематодами [Dodueva, Frolova, Lutova, 2007]. Наиболее изученными среди данной группы организмов являются роды *Globodera* и *Heterodera* (т. н. cyst nematodes, формирующие новообразования синцитиального строения) и род *Meloidogyne* (относится к т. н. root-knot nematodes, индуцируемые которыми опухоли демонстрируют крайнюю гипертрофию клеток) [Bird, Koltai, 2000]. Ранее исследования механизма опухолеобразования нематодами были направлены на поиски у них классических фитогормонов и соответствующих генов/белков; действительно, в секрете *Heterodera schachtii* и *Meloidogyne incognita* было найдено по 10 цитокининов зеатинового и изопентенилового типа [Vanholme et al, 2004]. Сравнительно недавно у фитонематод были открыты функциональные гомологи пептидов CLE [Ali et al, 2017]. Впервые такие пептиды были найдены у цистообразующих нематод *Heterodera glycines* [Wang et al, 2005]. Примечательно, что CLE-домены белков нематод демонстрируют сходство с соответствующими доменами (и, соответственно, зрелыми пептидами) CLE растения-хозяина [Ali et al, 2017].

#### 1.3.2.4. Естественные опухоли растений

Формирование естественных опухолей отмечено у многих видов растений [Ahuja, 1998]. К основным причинам возникновения таких опухолей можно отнести:

- мутации по генам, контролирующим клеточный цикл или гормональный фон;
- эффекты аут- или, напротив, инбридинга.

Наиболее изученной моделью опухолеобразования у растений являются опухоли у межвидовых гибридов табака (*Nicotiana spp.*), впервые описанные в 1930 году [Dodueva, Frolova, Lutova, 2007]. Данные образования возникают у растений на стадии цветения на надземных органах, преимущественно на стебле, хотя показано, что при поранении или облучении рентгеновскими лучами можно добиться более раннего появления опухолей [Ahuja, 1998].

Опухолообразующие гибриды появляются в потомстве от скрещивания видов из секции *Alatae* (например, *N. langsdorfii*; n =9-10) и секции *Paniculatae* (например, *N. glauca*; n = 12) или некоторых других секций [Matveeva, Lutova, 2014]. Показано, что в ряду насыщающих скрещиваний признак опухолеобразования сохраняется до тех пор, пока в геноме присутствуют несколько хромосом от вида из *Paniculatae*, что позволило предположить, что

за формирование опухолей у гибридов отвечают специфические гены представителей этой секции [Smith, 1988][Smith, 1988]. Дальнейшие эксперименты показали, что геномы представителей *Alatae* содержит некий однокопийный элемент *I* (от Initiator), запускающий программу опухолеобразования, а геномы *Paniculatae* — элементы *ee* (enhancers), отвечающие за ее дальнейшее развитие. В качестве *ee*-элементов рассматриваются гомологи генов *rol* агробактерий, обнаруженные в геномах представителей соответствующей трибы [Intrieri, Buiatti, 2001].

Переход гибридного растения сопровождается резким падением концентрации ауксина, после чего наблюдается, напротив, резкий (в 30-80 раз) подъем концентрации этого гормона [Dodueva, Frolova, Lutova, 2007]. Это позволяет предположить, что запуск программы опухолеобразования обеспечивается цитокинин-чувствительными генами, в то время как дальнейшее изменение соотношения ауксинов и цитокининов в пользу первого необходимо для дальнейшего роста опухоли и ее васкуляризации.

Помимо аутбридинга, к опухолеобразованию у представителей рода *Nicotiana* приводят мутации по гену CHYTINASE RECEPTOR KINASE 1 (CHRK1). Данный ген кодирует Ser/Thr RLK, рецепторный домен которой близок к растительным хитиназам класса V, однако несет замену Gln139Val в консервативной позиции и поэтому не проявляет явной хитиназной активности [Kim et al, 2000]. Экспрессия соответствующего гена наблюдается в SAM, листовых примordiaх, молодых листьях и проводящих пучках [Lee et al, 2003]. Мутанты по соответствующему гену демонстрируют, помимо всего прочего, спонтанное возникновение на ранних стадиях развития каллусоподобных образований, способных к гормон-независимому росту. К другим проявлениям *chrk1*-фенотипа можно отнести карликовость, деэтиоляция в темноте, отсутствие апикального доминирования (активный геммогенез) и прочие проявления конститутивного ответа на цитокинин [Lee et al, 2003].

Опухолообразующие фенотипы известны и у арабидопсис. Соответствующие мутанты делятся на две группы: *tumorous shoot development (tsd)* и *pasticcino (pas)* [Faure et al, 1998; Frank et al, 2002]. Для мутантов из обеих групп характерен неизмененный гормональный фон при измененном уровне экспрессии ауксин- и цитокинин-чувствительных генов. Для фенотипа *tsd* характерна потеря межклеточной адгезии. Для двух из трех *tsd*-мутантов показаны конкретные функции затронутых мутацией генов: TSD1 кодирует глюканазу, участвующую в биосинтезе целлюлозы, в то время как TSD2 кодирует метилтрансферазу, также участвующую в модификации компонентов клеточной стенки [Krupková et al, 2007; Krupková, Schmülling, 2009]. Мутанты *pas* имеют схожий, хотя и менее выраженный фенотип, что и *tsd*. Для данного фенотипа также выявлено три группы комплементации. Все

три гена кодируют белки, участвующие в синтезе особо длинных жирных кислот, входящих в состав сфинголипидов с сигнальными функциями. Ген PAS1 кодирует белок класса иммунофилинов, выполняющий роль скэффолд-белка для ферментативного комплекса элонгазы жирных кислот; в свою очередь, PAS2 кодирует 3-гидроксиацил-CoA дегидратазу, а PAS3 — ацетил-CoA карбоксилазу [Nobusawa et al, 2013; Roudier et al, 2010].

#### 1.3.2.5. Естественные опухоли инбредных линий редиса

В отличие от межвидовых гибридов табака, редис (*Raphanus sativus* var. *radicola*) демонстрирует признак опухолеобразования только в инбредных скрещиваниях и при самоопылении. Показано, что данный признак номинально относится к полигенным, но в отдельных вариантах скрещивания проявляет себе как моногенный [Matveeva et al, 2004].

Опухоли формируются на корнях и в нижней части корнеплода на этапе цветения, что хорошо соотносится с предложенной для табака моделью, при которой опухолеобразование индуцируется увеличением концентрации цитокинина относительно ауксина. Кроме того, во всех проведенных исследованиях показано, что опухолеобразующие растения накапливают примерно в 3 раза больше цитокининов зеатинового типа по сравнению с растениями дикого типа [Dodueva, Frolova, Lutova, 2007]. Показательно, что некоторые инбредные линии, не образующие опухоли *in vivo*, формируют опухолеподобные структуры в области главного корня и нижней части гипокотилия при выращивании на цитокинин-содержащей среде [Piina et al, 2006]. Аналогичных результатов для неопухолеобразующих линий можно добиться путем трансформации растений геном *ipt A. tumefaciens* [Matveeva et al, 2004]. С другой стороны, к опухолеобразованию приводит и трансформация генами-модуляторами чувствительности к ауксину *rolB* и *rolC A. rhizogenes* [Dodueva et al, 2008]. Таким образом, на формирование опухолей влияет не только концентрация цитокинина, но и чувствительность клеток к фитогормонам. Одним из подтверждений данному предположению может служить то, что экспрессия генов раннего ответа на цитокинины, в частности, *ARR5*, наступает в опухолеобразующих растениях раньше и при меньшей концентрации цитокинина по сравнению с растениями дикого типа [Dodueva, Frolova, Lutova, 2007].

Показано, что опухоли при эксплантации способны к автономному росту на культуральной среде. С другой стороны, при добавлении в среду ауксинов и цитокининов в разных

соотношениях опухоли демонстрируют некротизацию вместо дальнейшего роста и/или ризо- или геммогенеза [Il'ina et al, 2006].

На гистологическом уровне опухоли редиса неоднородны. В частности, в составе опухолевой ткани имеются проводящие пучки, окруженные аналогами латеральных меристем [Il'ina et al, 2006]. Кроме того, в опухолях обнаружены аналоги апикальных меристем, отличающиеся локальным повышением концентрации ауксина и экспрессией гена *WOX5*, являющегося компонентом *WOX-CLE* системы в апикальной меристеме корня [Lebedeva et al, 2015]. Последнее, в совокупности с приуроченностью опухолей к корневым структурам, позволяет предположить связь между опухолями и программами развития бокового корня.

## **2. Материалы и методы**

### **2.1. Растительный материал**

Объектом работы послужили растения редиса линии 19 (сорт Сакса), склонные к образованию корневых опухолей после перехода к цветению [Il'ina et al, 2006]. и не образующие опухолей растения линии 28. Семена обеих линий были получены из коллекции кафедры генетики и биотехнологии Санкт-Петербургского государственного университета [Buzovkina, Lutova, 2007].

### **2.2 Подбор праймеров для ПЦР и ОТ-ПЦР в реальном времени**

В качестве референсного генома для редиса использовался текущая версия, используемая в базе Radish Genome Database (<http://radish-genome.org>) [Mun et al, 2014]. В случае невозможности подбора праймеров к последовательностям редиса использовалась текущая версия генома арабидопсис, используемая в базе The Arabidopsis Information Resource (TAIR10)[Berardini et al, 2015]. Праймеры к кодирующей последовательности подбирались сообразно аннотации данной последовательности в геноме, при этом F-праймер подбирался так, чтобы старт-кодон располагался максимально близко к 5'-концу праймера; аналогично, R-праймер содержит максимально близко к 5'-концу стоп-кодон. В качестве промотора бралась последовательность длиной в 2-2.5 kb в 5'-области относительно кодирующей последовательности, а в качестве терминатора — 2-2.5 kb в 3'-области относительно кодирующей последовательности.

Праймеры для клонирования фрагментов и проверки успешного встраивания фрагментов в вектор подбирались с использованием программы Primer3 [Untergasser et al, 2012]. К праймерам, использовавшимся непосредственно для клонирования фрагментов, добавлялись с 5'-конца фланкирующие адаптеры для GateWay<sup>TM</sup>-клонирования в соответствии с руководством [Wall et al, 2014]. Последовательности праймеров см. в Приложении 1. Все праймеры, включая подобранные с использованием геномных последовательностей арабидопсис, тестировали на геномной ДНК редиса.

### **2.3. Выделение РНК из опухолевого материала и проверка наличия транскриптов при помощи ОТ-ПЦР в реальном времени**

Для проверки факта экспрессии генов PXY, CRN и CLV2 мы выделили из опухолей редиса РНК с последующим получением кДНК и постановкой ОТ-ПЦР. Материал был собран с растений редиса линии 19 (см. Растительный материал), выращиваемых в Петергофе на участке лаборатории ГКИР кафедры генетики и биотехнологии СПбГУ. РНК выделяли при помощи набора RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Germany) в соответствии с рекомендациями производителя. Для выделения РНК взяли две пробы опухолевой ткани и фрагмент главного корня редиса в качестве положительного контроля. Полученные пробы РНК очищали от остатков ДНК при помощи набора DNA-free<sup>TM</sup> DNA Removal Kit (Thermo Fisher Scientific, USA). 700 нг РНК из каждой пробы использовали для получения кДНК при помощи набора RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, USA) с использованием праймера oligodT (25 нуклеотидов). Концентрацию РНК и кДНК измеряли при помощи спектрофотометра NanoDrop 2000c UV-Vvis (Thermo Scientific, USA).

С полученной кДНК поставили ОТ-ПЦР в реальном времени с использованием набора реактивов фирмы Синтол<sup>TM</sup> и амплификатора CFX96 Real-Time PCR System (Bio-Rad, USA). В качестве контроля использовали обратные транскрипты убиквитина с праймерами, подобранными к соответствующему транскрипту *Brassica napus*. И использованные в ходе ОТ-ПЦР праймеры представлены в табл. 1. Результаты ПЦР в реальном времени оценивались по дельта-дельта методу при помощи пакета „pcr“ для языка R [Ahmed, Kim, 2018; Pfaffl, 2001].

### **2.4. Выделение геномной ДНК редиса и арабидопсис**

Геномную ДНК для выделяли из проростков редиса и арабидопсис возрастом 5-7 дней. 0.5 г растительного материала растирали с жидким азотом в пробирке объемом 1.5 мл при

помощи гомогенизатора TissueLyser LT (Qiagen, Germany). В пробирку с мацерированным материалом добавляли 500 мкл нагретого 2х буфера для экстракции со СТАВ (2хСТАВ-БЭ), после чего инкубировали пробирку в течение 40 минут при температуре 65 °С. После инкубации в пробирку добавляли 500 мкл смеси этанол: изоамиловый спирт в соотношении 24:1 и перемешали содержимое путем переворачивания пробирки в шейкере Bio Shaker 3D (Bio-San, Latvia) в течение 30 минут. Затем содержимое пробирки центрифугировали в течение 20 минут в настольной центрифуге /название настольной центрифуги/ при ускорении 10000g. Супернатант отбирали в чистую пробирку объемом 1.5 мл и добавляли 0.5 объема изопропанола, после чего инкубировали в течение 2 ч при температуре -20 °С. После инкубации содержимое центрифугировали в настольной центрифуге в течение 20 минут при ускорении 10000g, сливали супернатант, осадок промывали осадок холодным 70% этанолом и затем высушивали в ламинаре под потоком воздуха в течение 20-40 минут в зависимости от объема осадка. Высушенный осадок растворяли в 100 мкл дистиллированной воды. Концентрацию раствора измеряли при помощи спектрофотометра NanoDrop 2000c UV-Vvis (Thermo Scientific, USA). Сток ДНК хранили при температуре -20 °С в течение 2-3 месяцев, периодически отбирая аликвоты для использования в дальнейшей работе.

## **2.5. Амплификация фрагментов геномной ДНК и трансляционное слияние фрагментов**

ПЦР осуществляли с использованием высокоточной полимеразы Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase и соответствующих компонентов реакционной смеси (ThermoFisher Scientific, USA) на амплификаторе MyCycler™ Thermal Cycler System With Gradient Option (Bio-Rad, USA). Для трансляционного слияния кодирующих последовательностей генов интереса и репортерных генов использовали специфический набор праймеров. Клонированные фрагменты использовали в качестве матриц при постановке Phusion-ПЦР; рекомбинантные фрагменты ДНК разделяли при помощи электрофореза аналогично описанному выше. Программы ПЦР для амплификации и трансляционного слияния конкретных последовательностей приведены в Приложении 2.



## 2.6. Гель-электрофорез и выделение ДНК из агарозного геля

Результаты ПЦР и рестрикции разделяли методом электрофореза в 1% агарозном геле, при этом для аналитических проб в качестве интеркалирующего агента использовали бромистый этидий, а для препаративных – реагент SYBR Safe (Thermo Fisher Scientific, USA). Визуализацию результатов электрофореза осуществляли при помощи трансиллюминатора или Gel Doc™ EZ Gel Documentation System (BioRad, USA).

Выделение фрагментов ДНК из агарозного геля производили при помощи набора Cleanup Mini (Евроген, Россия) в соответствии с инструкциями производителя. Концентрацию выделенных фрагментов измеряли при помощи спектрофотометра NanoDrop 2000c UV-Vis.

## 2.7. Клонирование фрагментов в векторы экспрессии методом GateWay™

Полученные фрагменты ДНК встраивали в векторы экспрессии методом GateWay™ [Katzen, 2007]. Для анализа локализации доменов экспрессии генов интереса и белков-продуктов экспрессии были выбраны два типа бинарных векторов: двухкомпонентные, содержащие промотор соответствующего гена и кодирующую последовательность гена β-глюкуронидазы *E. coli* (GUS), и трехкомпонентные, содержащие промотор, терминатор и кодирующую последовательность гена интереса, слитую с репортерным геном (рис. 2, Прил. 3).

Аmplифицированные фрагменты ДНК встраивали в вектор pDONR с использованием ферментативной смеси BP Clonase II (Thermo Fisher Scientific, USA в соответствии с рекомендациями производителя. Полученные pENTR – векторы подвергались рекомбинации с другими компонентами конечного вектора, включая вектор pDEST, при помощи ферментативной смеси LR Clonase (Thermo Fisher Scientific, USA). Для двухкомпонентных векторов в качестве вектора экспрессии использовали pBGWFS7.0, для трехкомпонентных – pKm4.3GW; оба вектора несли устойчивость к спектиномицину (*spR*), а также утрачиваемую после рекомбинации устойчивость к хлорамфениколу. Все реакции рекомбинации инкубировали при +25 °C в амплификаторе «Терцик» (ДНК-Технология, Россия) в течение ночи для увеличения конечного выхода. Реакцию останавливали путем

добавления протеиназы Proteinase K (Thermo Fisher Scientific, USA) в отношении к Clonase 1:2, инкубировали в течение 10 минут при +37 °C и затем использовали для трансформации бактерий.

## **2.8. Трансформация бактерий *Escherichia coli* и *Agrobacterium rhizogenes***

Для трансформации *E. coli* первоначально мы использовали химически компетентные к трансформации бактерии (далее: компетенты) штамма DH5 $\alpha$ , однако впоследствии заменили их на химических компетентов штамма Top10 (Thermo Fisher Scientific, USA). Пробирку объемом 1.5 мл с химическими компетентами инкубировали на ледяной бане в течение 10 минут, после чего добавляли в пробирку полный объем реакции рекомбинации BP/LR, затем инкубировали еще в течение 10-15 минут, помещали на 35 секунд в температуру 42 °C для индукции теплового шока, снова переносили на ледяную баню на 5 минут, добавляли 500 мкл жидкой среды LB и помещали в термостат с шейкером на 1-3 часа при температуре +37 °C. После инкубации суспензию бактерий центрифугировали на настольной центрифуге при ускорении 5500g, сливали большую часть супернатанта, в остатках супернатанта ресуспендировали бактериальный осадок и переносили на чашку Петри с твердой средой LB и соответствующим антибиотиком. Для отбора бактерий с плазмидами типа pENTR использовали канамицин (C = 50 мг/мл), с векторами экспрессии – спектиномицин (C = 100 мг/мл); оба антибиотика добавлялись в среду в соотношении 1:1000. Чашки Петри с бактериальным посевом инкубировали в термостате при температуре +37 °C в течение одной ночи.

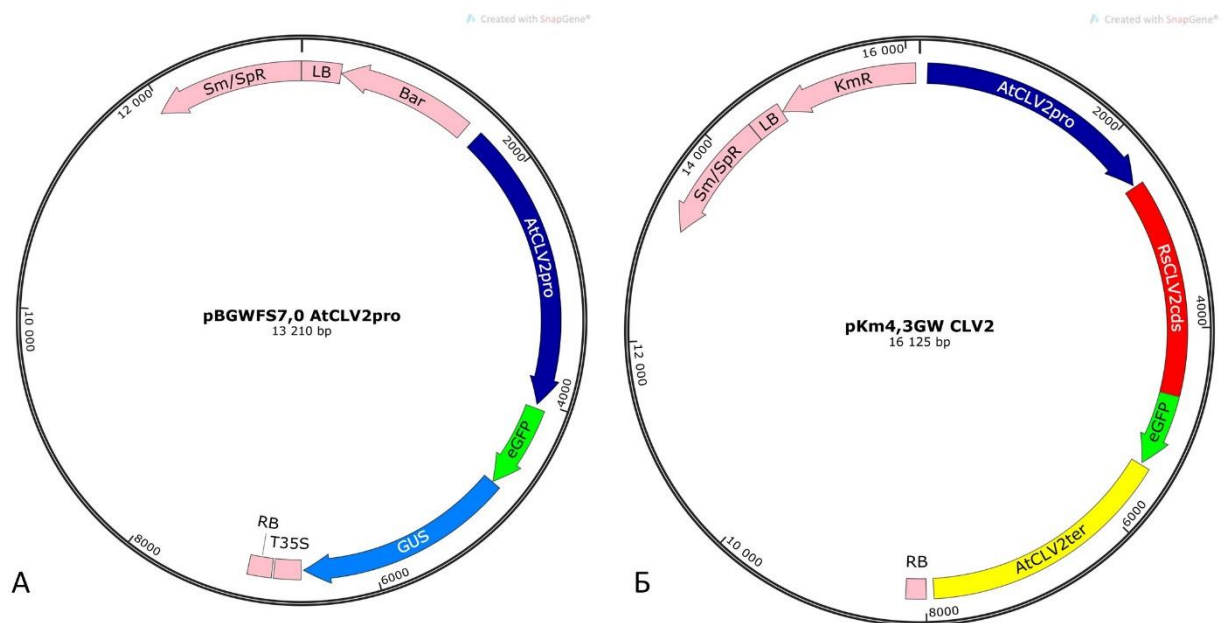


Рисунок 1. Примеры векторов, использованных в данной работе. А. Вектор, содержащий промотор RsCLV2::GUS. Б. Вектор, содержащий продукт трансляционного слияния кодирующих последовательностей RsCLV2::RsCLV2-eGFP. Карты плазмид сделаны в приложении SnapGene® Viewer

Для трансформации *A. rhizogenes* использовали химические и электрические компетенты штамма MSU440. Пробирку объемом 1.5 мл с химическим компетентами инкубировали на ледяной бане в течение 10 минут, после чего добавляли в пробирку 100-500 нг плазмидной ДНК и инкубировали на ледяной бане в течение 30 минут, перемешивая содержимое пробирки переворачиванием раз в 10 минут. Тепловой шок индуцировали путем помещения пробирки на 1 минуту в жидкий азот и затем на 5 минут в термостат при температуре +37 °C. После холодового шока в пробирку добавляли 500 мл жидкой среды LB и помещали пробирку в термостат с шейкером на 2-3 ч при температуре +30 °C. После инкубации суспензию бактерий центрифугировали на настольной центрифуге при ускорении 5500g, сливали большую часть супернатанта, в остатках супернатанта ресуспендировали бактериальный осадок и переносили на чашку Петри с твердой средой LB и соответствующим антибиотиком. Для отбора трансформантов использовали спектиномицин в стандартной концентрации в отношении 1:1000. Чашки Петри с бактериальным посевом инкубировали в термостате при температуре +30°C в течение двух суток.

Помимо химических компетентов, для трансформации использовались также электрические компетенты штамма MSU440 *A. rhizogenes*. В отличие от протокола

трансформации химических компетентов, протокол для электрических компетентов вместо индукции холодного шока включал электропорацию коротким разрядом при напряжении 1250В в электропораторе Eporator® (Eppendorf, Germany). Генотипы использованных штаммов бактерий приведены в Табл. 1.

Штамм	Генотип
<i>E. coli</i> DH5α	F- <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoRnupG Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK- mK+), λ-</i>
<i>E. coli</i> TOP 10	<i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS- mcrBC) Phi80lacZ(del)M15 ΔlacX74 deoR recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU, galK rpsL(SmR) endA1 nupG</i>
<i>A. rhizogenes</i> MSU440	<i>rif</i>

Таблица 1. Использованные штаммы *E. coli* и *A. rhizogenes*

## 2.9. Выделение плазмид из бактериальных трансформантов

Плазмиды из бактерий выделялись при помощи коммерческого набора Plasmid Miniprep (Евроген, Россия) в соответствии с инструкциями производителя. Для выделения бактерии инокулировались в жидкой культуре (3 мл жидкой среды + селективный агент стандартной концентрации в отношении 1:1000) и инкубировались в термостате либо при температуре +37 °С в течение 1 ночи (*E. coli*), либо при температуре +30 °С в течение двух суток (*A. rhizogenes*). Концентрация раствора с выделенной плазмидной ДНК измерялась при помощи спектрофотометра NanoDrop 2000c UV-Vvis.

## 2.10. Проверка вставки в вектор при помощи ПЦР, рестрикции и секвенирования по Сэнгеру

Для проверки вектора на наличие вставки использовались рестрикционное картирование и ПЦР с Taq-полимеразой. При рестрикционном картировании использовались эндонуклеазы рестрикции и буфер 2x FD GreenBuffer из комплекта FastDigest (Thermo Fisher Scientific, USA). Для осуществления рестрикции компоненты смешивались в следующем соотношении:

- плазмидная ДНК – 1000 нг;
- 10x FD Green Buffer – 2 мкл;
- эндонуклеазы рестрикции – по 1 мкл каждой;
- dH<sub>2</sub>O – до 20 мкл.

Реакционную смесь инкубировали в течение 0.5-3 часов при температуре +37 °С, после чего наносили на 1% агарозный гель с бромистым этидием для визуализации результатов рестрикции.

ПЦР для проверки наличия вставки использовали при неоднозначности результатов рестрикции. При постановке ПЦР использовались комплекты набора (Евроген, Россия). Состав реакционной смеси имел следующий вид:

- dH<sub>2</sub>O – 13.5 мкл;
- 2xTaq Buffer – 2 мкл;
- 50x dNTP – 1 мкл;
- плазмидная ДНК (в концентрации 20-50 нг/мкл) – 1 мкл;
- F-праймер – 1 мкл;
- R-праймер – 1 мкл;
- Taq-полимераза – 1 мкл.

Для проверочной ПЦР использовались аналоги праймеров для клонирования фрагментов из геномной ДНК, лишенные адаптеров для GateWay<sup>TM</sup> клонирования. Программы ПЦР см в Прил. 2.

Векторы, показавшие положительный результат при ПЦР и рестрикции, отправлялись на РЦ РмиКТ СпбГУ для дальнейшего секвенирования по Сэнгеру на капиллярном секвенаторе ABI Prism 3500xl (Thermo Fisher, USA). Полученные результаты визуализировались в виде хроматограммы в программе UGENE [Okonechnikov et al, 2012]. Полученная в результате секвенирования последовательность проверялась на соответствие

исходной вставке при помощи локального выравнивания в NCBI BLAST [Altschul et al, 1990].

## **2.11. Условия выращивания растений и трансформация при помощи *Agrobacterium rhizogenes***

Семена стерилизовались путем экспозиции в течение 7-10 минут в смеси 96% этанол: пероксид водорода в соотношении 1:1 при перемешивании в шейкере. Стерилизованные семена высаживались на чашки Петри с 20 мл MS20 (Murashige-Skoog 20)[Murashige, Skoog, 1962] и проращивались в фитотроне при температуре +21<sup>0</sup>С и световом режиме l:d 16:8.

Для трансформации использовались растения возрастом 5-7 дней. Гипокотиль растения полностью отсекался скальпелем в стерильных условиях, после чего место поранения инокулировалось суспензией *A. rhizogenes* штамма MSU440, выращиваемой на твердой среде LB при температуре +30<sup>0</sup>С. После трансформации растения пересаживались на новую чашку с 20 мл среды MS20. Первая генерация адвентивных корней удалялась, после чего растения переносились на новую чашку Петри с 20 мл среды MS0 с добавлением цефотаксима (C = 300 мг/мл, разведение 1:1000) и бумажным фильтром, при этом чашка фиксировалась в вертикальном положении. По достижении вторым поколением адвентивных корней оптимальной длины растения пересаживались в горшки с вермикулитом, обильно поливались водой, изолировались пищевой пленкой и оставлялись при температуре + 25<sup>0</sup>С, освещенности ~3000 люкс и световом режиме l:d 16:8. Спустя день после посадки растения регулярно проветривались, вплоть до полного удаления пленки.

По достижении определенного размера (через 2 недели – месяц после пересадки в вермикулит) растения пересаживались в почву и выращивались при тех же условиях до увеличения размеров надземной части в ~ 2 раза. После этого горшки с растениями переносились в теплицу Ботанического сада СПбГУ, где выращивались при комнатной температуре, освещенности 15000 люкс и световом режиме l:d 12:12 с использованием светодиодной фитолампы Uniel Led Lamp For Plants (Uniel, China) (Рис. 2). Раз в 10 дней растения поливались разведенным в 10 раз жидким органическим удобрением «Идеал» (ФАРТ, Россия).



*Рисунок 2.* Выращивание растений в теплице Ботанического сада СПбГУ (экспериментальные растения – в зеленых горшках на фото слева).

## **2.12. Приготовление микропрепаратов и конфокальная микроскопия**

Бородатые корни и образующиеся в сайте инокуляции агробактериями опухоли проверялись на наличие флуоресцентного сигнала при помощи универсального стереоскопического комплекса на базе флуоресцентного моторизованного стереомикроскопа Leica M205 FA. В результате было детектировано слабое свечение в кончиках бородатых корней.

На следующем этапе были подготовлены препараты для дальнейшей проверки на конфокальном флуоресцентном микроскопе в соответствии с существующим протоколом [Pina et al, 2018]. Для приготовления микропрепаратов были взяты кончики бородатых корней длиной 6-10 мм, а также тотальные опухоли, формирующиеся в сайте инокуляции. Для корнеплодов делались поперечные срезы в нижней трети органа, которые затем нарезались на радиальные сектора. Материал помещался в раствор для фиксации следующего состава:

- 0.1М фосфатный буфер (PB);

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  – 0.0358 г/мл;
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 0.0156 г/мл;
- 1% параформальдегид (PFA);
- 0.0137 г/мл L-лизин монохлорида (L-lysine monochloride, Sigma, L-5626);
- 0.0021 г/мл периодата натрия (Sodium-m-periodate, Sigma, S-1878);
- 5% диметилсульфоксид (DMSO);

После помещения материала в раствор для фиксации из пробирок с материалом при помощи вакуумного насоса 1С (Vacuubrand, Germany) откачивался воздух 5 раз по 3 мин, при этом воздух из насоса выпускался плавно во избежание повреждения материала. Затем пробирки оставались на 1 ч при комнатной температуре. После этого материал промывался один раз в течение 20 мин буфером для хранения следующего состава:

- 0.1М фосфатный буфер (PB);
- 0.0137 г/мл L-лизин монохлорида;

После промывки материал помещался в буфер для хранения и оставлялся на ночь в холодильнике при температуре +4 °C.

Для препаратов корнеплодов использовался аналогичный протокол, однако

Для приготовления препаратов зафиксированный материал бородатых корней помещался в формочки и заливался 2% агарозой; препараты корнеплодов за счет их высокой плотности, напротив, не фиксировались в агарозе. Застывшие агарозные блоки либо фрагменты корнеплодов использовались для приготовления микропрепаратов на вибротоме Leica VT1200S со следующими параметрами резки:

- FEED (толщина среза) – 65 mkm (для корнеплодов – 85 mkm);
- FREQ (частота вибрации лезвия) – 50;
- AMPL (амплитуда вибрации лезвия) – 0.4 mkm;



- $V$  (скорость движения лезвия) – 0.09 mkm/s.

Срезы собирались в пластмассовые планшеты с водой, после чего из них при помощи вакуумного насоса откачивался воздух 2-3 раза по 3 мин. После этого срезы помещались в 1% раствор пропидий йодида (PI) в дистиллированной воде на 30 минут и оставлялись в темноте, затем промывались дистиллированной водой 3 раза по 5 минут (в это время срезы также содержались в темноте). Готовые препараты заключались в 130 мкл Citi Fluor AF4 с добавлением нескольких капель антифейда ProLong Gold Antifade Mountant (Thermo Fisher Scientific), закрывались покровным стеклом и запечатывались лаком. Срезы хранились на +4 °C в течение 1-2 ночей.

Микроскопия производилась с использованием лазерного конфокального сканирующего микроскопа Leica TCS SP5 при увеличении 40х с глицериновой иммерсией с использованием двух каналов возбуждения и регистрации: пропидий йодид возбуждался при  $\lambda = 488$  нм, флуоресценция регистрировалась в диапазоне  $\lambda = 585\text{--}615$  нм; eGFP возбуждался при  $\lambda = 488$ , флуоресценция регистрировалась при  $\lambda = 510$  нм. Изображения снимались в виде Z-стэков.

Проекции Z-стэков собирались и обрабатывались при помощи программы LASX от Leica. При наличии сигнала более чем от одного канала регистрации соответствующие проекции при получении финального изображения. Кроме того, к изображению добавлялась масштабная линейка.

### 2.13. Приготовление препаратов для GUS-окрашивания

Материал (бородатые корни) помещался на 10 минут в NT-буфер состава:

- 100 mM Трис-Cl
- 100 mM NaCl

К буферу добавлялись 200 мкл феррицианида калия ( $K_3[Fe(CN)_6]$ ), 40 мкл диметилсульфоксида (DMSO) и 0.01 г X-Gluc. Пробирки инкубировались 2 часа при температуре 37 °C, после чего материал переносился в фиксирующий раствор состава (на 50 мл):

- 38.8 мл TBS-буфера;

- 5 мл 30% параформальдегида (PFA);
- 1 мл 25% глутаральдегида (GA);
- 100 мкл 0.2% Tween;
- 100 мкл 0.2% TritonX100;
- 5 мл DMSO

Препараты в фиксирующем растворе переносились в эвапоратор на 20 минут, после чего оставлялись на ночь при температуре + 4. На следующий день препараты промывались TBS 3 раза по 15 минут. Далее препараты выдерживались последовательно в 10%, 20% и 30% этиловом спирте по 30 минут и в 40%, 50% и 60% спирте по 1 часу, после чего переносились на ночь в 70% спирт. На следующий день препараты переносились в TBS буфер, фиксировались в 2% агарозе и нарезались при помощи вибротома Leica VT1200S с параметрами, аналогичными указанным выше.

### 3. Результаты

#### 3.1. Результаты ОТ-ПЦР и ОТ-ПЦР в реальном времени

В результате ОТ-ПЦР и дальнейшего гель-электрофореза было подтверждено наличие транскриптов всех трех генов интереса в опухолевом материале (*рис. 3, А*). Однако, ОТ-ПЦР в реальном времени не смогла выявить однозначного изменения уровня экспрессии генов относительно положительного контроля (фрагмента главного корня).

#### 3.2. Амплификация фрагментов ДНК и оптимизация протоколов ПЦР

В ходе работы были оптимизированы протоколы для всех имеющихся пар праймеров (*рис.3, Д*). В результате были получены 7 ПЦР-фрагментов. 6 из них использовались для дальнейшего клонирования в плазмиды. Фрагмент RsPXYcds использовали для трансляционного слияния с eGFP при помощи overlap-ПЦР. Примечательно, что ряд фрагментов (промоторы для RsCRN и RsCLV2) были амплифицированы с использованием праймеров, подобранных к соответствующим фрагментам генома арабидопсис (см. ниже).

#### 3.3. Конструирование векторов экспрессии

В ходе работы были получены векторы экспрессии для всех 6 конструкций (см. Материалы и методы, Прил. 3). Успешность реакций рекомбинации была подтверждена при помощи рестрикции (*рис. 3, Б-Г*) и секвенирования по методу Сэнгера в ресурсном центре «Развитие молекулярных и клеточных технологий» СПбГУ. Локальное выравнивание результатов секвенирования при помощи BLAST позволило также подтвердить получение промоторов генов CLV2 и CRN редиса с использованием праймеров для арабидопсис (соответствующие результаты имели статус „Predicted: R. Sativus promoter“); кроме того, все последовательности выравнивались на референсный геном редис при помощи BLAST-сервиса Radish Genome Database (*рис. 4*).

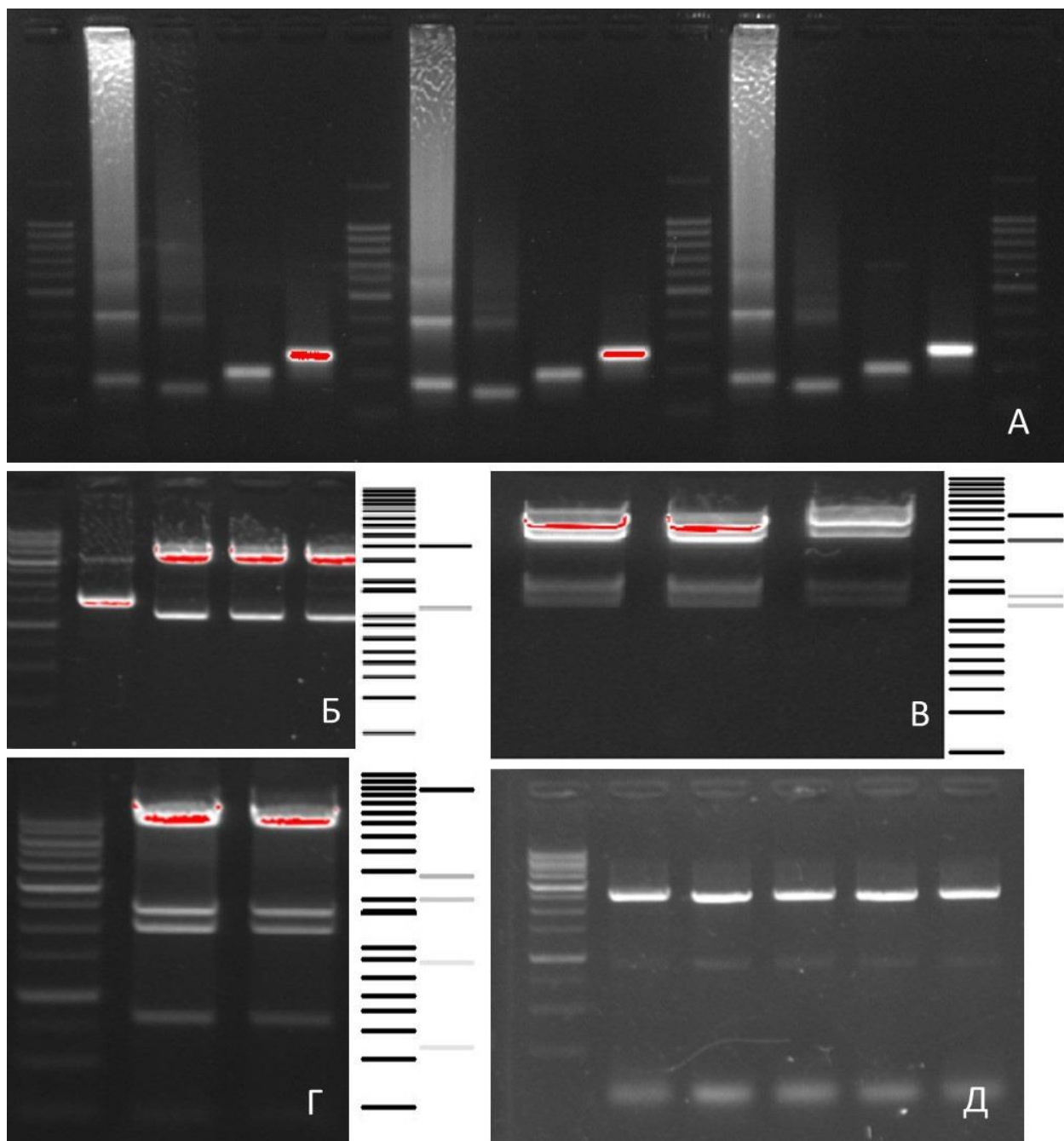


Рисунок 3. Визуализация гель-электрофореза в агарозном геле при помощи Gel Doc™ EZ Gel Documentation System. А. Результаты ОТ-ПЦР с кДНК, полученной из корневых опухолей редиса. Слева направо: маркер 1kb Ladder (Евроген), RsUBQ, RsPXY, RsCRN, RsCLV2. Реакция была поставлена в 2 биологических и 3 технических повторностях (на рисунке показаны не все). Б. Результаты рестрикции вектора pENTR4.1:RsPXYpro по сайтам BglII. В. Результаты рестрикции RsCLV2::GUS по сайтам NotI. Г. Результаты рестрикции RsCRN::RsCRN-eGFP по сайтам HindIII. Д. Результаты ПЦР RsPXYter attB 2,3. Ожидаемые результаты рестрикции визуализированы при помощи ApE Plasmid Editor®. Нотацию используемых векторов см. в Приложении 3.



RsCLV2::GUS	+	Химические
RsPXY::GUS	+	Химические
RsCRN::RsCRN-eGFP	+	Химические
RsCLV2::RsCLV2-eGFP	+	Электрические
RsPXY::RsPXY-eGFP	+	Электрические

Таблица 2. Эффективность трансформации агробактерий полученными конструкциями

### 3.5. Получение растительного материала и растений-трансформантов

Растения выращивались и трансформировались в соответствии с описанными методиками (см. «Материалы и методы»). Данные о растительном материале приведены в табл. 3.

	Линия 19	Линия 28
Семян посажено	860	493
Семян/растений потеряно (всего)	620	347
Растений трансформировано	340	196
Растений пересажено в вермикулит	90	75
Растений пересажено в почву	50	45
Растений пересажено в теплицу	3	20

Таблица 3. Сумма данных по растениям, высаженным за 06.2017-05.2018

Наиболее высокая смертность наблюдалась среди растений в чашках с культуральной средой; в ходе последовательных пересадок растений в вермикулит и почву потери растительного материала существенно снизились.

Нами были оптимизированы условия для выращивания растений в закрытом грунте в теплице (см. Материалы и методы), что позволило добиться увеличения размеров у всех



растений после переноса в теплицу. Из пересаженных в теплицу растений на момент зацвели и образовали корнеплод 13, из которых 10 относятся к линии 28, 3 — к линии 19 (рис. 5). Полученные корнеплоды сильно варьировали в диаметре (от 1 до 5 см самой широкой части).

Кроме того, для одного растения линии 19 было отмечено появление корневых опухолей. К сожалению, растения 19 линии демонстрируют снижение жизнеспособности вскоре после перехода к цветению, поэтому регистрация опухолей производилась *post mortem*. Кроме того, растения 19 линии по своим размерам также уступают растениям 28 линии.

Отдельные растения после пересадки в почву демонстрировали фенотип, характерный для ряда вирусных заболеваний, в частности, вызываемых геминивирусами из рода *Begomovirus*. Тем не менее, поражение вирусом не сказалось на росте и переходе к цветению.



Рисунок 5. Цветущие растения редиса (слева) и формирующиеся при выбранных условиях выращивания корнеплоды (справа).

### 3.5. Проверка успешности трансформации растений при помощи конфокальной микроскопии

В результате конфокальной микроскопии была подтверждена успешность трансформации растений обеих линий конструкциями AtCRN::AtCRN-eGFP и AtCLV2::AtCLV2-eGFP. Для распознавания сигнала eGFP от возможной автофлуоресценции мы сравнивали полученные данные с результатами, имеющимися в литературе для арабидопсис [Somssich, Bleckmann, Simon, 2016]. Для ряда препаратов мы не использовали пропидий йодид для контрастирования клеточных стенок с целью облегчения методики и определения влияния использования пропидий йодида на интерпретируемость получаемых изображений (*рис. 6*).

Кончики придаточных корней демонстрируют паттерн распределения сигнала, согласующийся с литературными данными: например, для CLV2 сигнал регистрируется в апексе корня и отдельных клетках эпидермиса, хотя в стеле интенсивный сигнал не наблюдается (*рис. 6, А*). Кроме этого, в трансформантах RsCRN::RsCRN-eGFP наблюдается интенсивный сигнал в структурах, которые были интерпретированы нами как примордии боковых корней (*рис. 6, Б-В*), что никак не отражено в имеющихся литературных источниках. В препаратах опухолей из сайта инокуляции сигнал был идентифицирован только в растущих придаточных корнях (*рис. 6, Г*), однако высокий уровень фоновой автофлуоресценции на изображениях, прежде всего со стороны ксилемы, не позволяет делать однозначных выводов относительно этих препаратов.



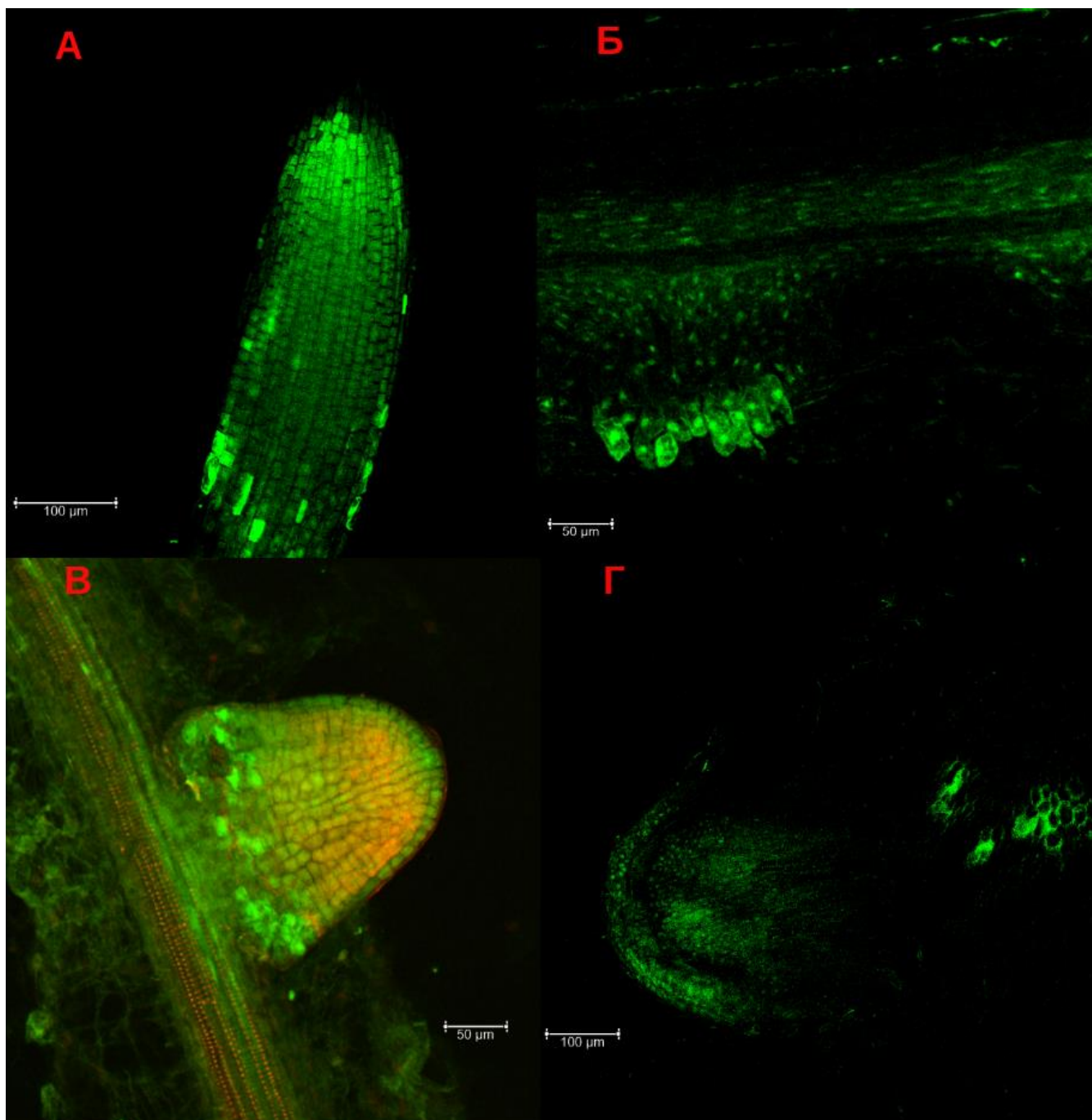


Рисунок 7. Изображения, полученные при помощи конфокального микроскопа. А. Кончик бородастого корня, RsCLV2::RsCLV2-eGFP: сигнал наблюдается в апикальной меристеме, а также в отдельных эпидермальных клетках. Б. Корневая структура (предположительно, примордий бокового корня, RsCRN::RsCRN-eGFP. В. Боковой корень, RsCRN::RsCRN-eGFP: добавление пропидий йодида позволяет визуализировать границы клеток и нивелировать автофлуоресценцию. Г. Опухоль, образовавшаяся в сайте инокуляции *A. rhizogenes*, RsCRN::RsCRN-eGFP: сигнал GFP наблюдается в растущем бородастом корне; сигнал в центре изображения – автофлуоресценция ксилемы. Изображения получены при помощи конфокального микроскопа Leica TCS SP5 и обработаны в Leica LasX.

#### 4.6. Анализ трансгенных корнеплодов при помощи флуоресцентной микроскопии

Для выращиваемых в теплице растений производилась микроскопия сегментов поперечных срезов нижней трети корнеплода (см. Материалы и методы). Для растений с небольшим диаметром корнеплода (~ 1 см) брался тотальный поперечный срез, в то время как для корнеплодов большего диаметра поперечный срез делился на сектора, иногда — с последующим разделением по средней линии.

Всего были проанализированы корнеплоды из шести растений 28 линии. В двух растениях, трансформированных конструкцией AtCLV2::AtCLV2-eGFP наблюдался флуоресцентный сигнал внутри паренхиматозных клеток, который был интерпретирован как рецепторные комплексы в составе ЭПР (рис. 7). Из-за высокого нижнего порога увеличения использованного микроскопа тотальные изображения, позволяющие дать гистологическую интерпретацию данному сигналу, не были получены. Анализ препаратов корнеплодов четырех других растений не выявил флуоресцентного сигнала.

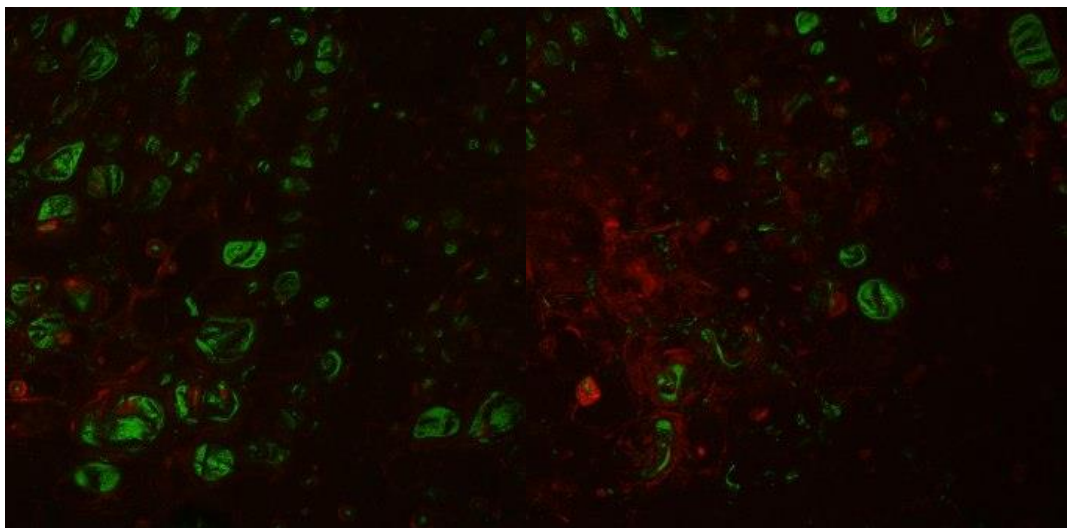


Рисунок 7. Экспрессия RsCLV2-eGFP в корнеплодах редиса 28 линии. Изображения получены при помощи конфокального микроскопа Leica TCS SP5 и обработаны в Leica LasX.

#### 4.7. GUS-окрашивание

Для бородатых корней 3 растений 28 линии, трансформированных RsPXY::GUS, было проведено GUS-окрашивание в соответствии с приведенной методикой (см Материалы и методы). Корни продемонстрировали положительное окрашивание, однако из-за нарушения протокола к моменту нарезки на вибротоме потеряли цвет. Тем не менее, это послужило демонстрацией успешности трансформации растений данной конструкцией.

## 4. Обсуждения

### 4.1. Результаты ОТ-ПЦР в реальном времени

В результате ОТ-ПЦР нам удалось продемонстрировать наличие транскриптов генов интереса в тканях опухолей. Это согласуется с представлениями о том, что в составе опухолей имеются меристемы, гомологичные апикальной меристеме корня и камбию, соответственно [Piina et al, 2006; Lebedeva et al, 2015]. Таким образом, несмотря на то, что трансгенные опухоли не были получены, в случае успешной трансформации представляется возможным проследить паттерн распределения экспрессии соответствующих генов.

Отсутствие дифференциальной экспрессии генов интереса по сравнению с главным корнем может быть как отражением реальной биологической картины, так и результатом неправильного дизайна исследования. В первом случае полученные результаты могут говорить об отсутствии различий между функционированием опухолевых и регулярных меристем или функциями белков интереса в данных меристемах. Тем не менее, поздний выход графика ОТ-ПЦР на плато в образцах, для которых успешность прохождения ОТ-ПЦР была продемонстрирована при помощи гель-электрофореза, говорит о возможном искажении полученных результатов. В частности, это может быть связано с выбранным нами референсным геном. Несмотря на филогенетическую близость родов *Raphanus* и *Brassica* и устоявшуюся практику использования генов RsUBQ в качестве референсных для растений, выбор референсного гена и праймеров к нему мог повлиять на итоговые результаты количественной ОТ-ПЦР [Al-Shehbaz, Beilstein, Kellogg, 2006; Huang et al, 2016][Додуева et al, 2013]. О несовершенстве протокола говорит большое количество неспецифики на дорожках, соответствующих UBQ, на гель-электрофорезе. Кроме того, появились данные о наиболее оптимальных референсных генах редиса для разных органов растения и разных экологических условий [Duan et al, 2017].

### 4.2. Амплификация последовательностей интереса

В ходе работы нами были получены все необходимые последовательности для дальнейшего создания векторов экспрессии. Отдельно стоит отметить, что последовательности промоторов для генов CLV2 и CRN были амплифицированы с использованием праймеров для соответствующих последовательностей арабидопсис. Несмотря на то, что два данных растения относятся к разным ветвям эволюции семейства *Brassicaceae* [Huang et al, 2016],

полученный результат позволяет с некоторой долей уверенности говорить о возможности использования генома арабидопсиса для подбора праймеров к участкам генома редиса в случае невозможности использования текущей версии сборки/аннотации генома редиса.

#### **4.3. Создание векторов**

Все заявленные конструкции были успешно собраны и использованы для трансформации растений. Обращает внимание, что при соблюдении всех требований к протоколу успешная сборка вектора осуществлялась с первого раза и за небольшое количество времени (не более недели лабораторной работы от момента получения ПЦР-продуктов до выделения плазмид из *E. coli* для дальнейшей проверки наличия вставки), что является несомненным преимуществом метода GateWay<sup>TM</sup>.

#### **4.4. Трансформация растений**

Анализ срезов бородатых корней трансформантов AtCRN на наличие eGFP-сигнала в большинстве случаев показало успешность трансгенеза. Вместе с тем анализ при помощи флуоресцентного стереомикроскопа позволил зарегистрировать очень слабый сигнал и только в ряде проанализированных корней. Это связано с тем, что гены CLV2 и CRN экспрессируются только в меристемах; добавление в векторы экспрессии репортера под контролем конститутивного промотора может существенно облегчить определение эффективности трансформации в дальнейших исследованиях.

Синее окрашивание в GUS-препаратах оказалось достаточно стойким в течение фиксации и хранения препаратов при +4° С, однако из-за ошибки в протоколе исчезло при переходе к приготовлению препаратов для микроскопии. Тем не менее, это говорит об успешной трансформации растений соответствующей конструкцией.

#### **4.5. Выращивание растений в почве и получение опухолей и корнеплодов**

Выращивание трансформантов в описанных условиях в теплице (см. Материалы и методы) позволило получить цветущие растения редиса со сформированными корнеплодами, а в случае растений 19 линии — и с опухолями. Данная методика позволила существенно сократить время, необходимое для получения трансгенных корнеплодов в закрытом грунте (~1 месяц после переноса в теплицу). Вместе с тем, используемая система обладает рядом

недостатков по сравнению с описанными в литературе примерами [Jang et al, 2015; Yu et al, 2016]. В частности, данная система не предполагает контроля влажности воздуха и температурного режима; в частности, в ряде описанных в литературе примеров температурный режим 25° С:18° С 16:8 отмечено как критическое условие для ускорения сроков получения корнеплодов.

Одной из главных проблем в ходе выращивания растений в теплице являлась низкая выживаемость растений линии 19, отмиравших вскоре после перехода к цветению. Подобный эффект, в частности, может быть связан с влиянием повышенного уровня цитокининов на чувствительность к абиотическому стрессу или поражению вирусами [Bielach, Hrtan, Tognetti, 2017].

#### **4.6. Гистологический анализ препаратов при помощи флуоресцентной микроскопии**

В ходе микроскопирования препаратов корнеплода экспрессия репортерной конструкции была показана в 2 трансформантах AtCLV2::AtCLV2-eGFP из 6 проанализированных. Низкая частота встречаемости трансгенных корнеплодов может быть связана с издержками используемой системы трансформации: в развитии бородатых корней участвуют как трансгенные клетки, так и соседние с ними [Peláez et al, 2017]. Также вполне возможно, что отсутствие сигнала является следствием ошибок на этапе приготовления препаратов.

Полученные для трансформантов изображения показали экспрессию трансгенных конструкций в корнеплодах, однако оказались недостаточно информативными для построения каких-либо выводов. Основные проблемы связаны с отсутствием на использованном конфокальном микроскопе малого увеличения, а также со слабой визуализацией клеточных границ. Для решения данной проблемы в дальнейшем предполагается анализ препаратов в проходящем свете (например, с использованием контраста Номарского) с дальнейшим слиянием изображений из флуоресцентного и оптического каналов.

## Выводы

В ходе данной работы были получены следующие выводы:

1. В опухолях редиса наблюдается экспрессия генов RsPXY, RsCRN и RsCLV2, при этом уровень экспрессии не отличается от уровня экспрессии в главном корне растения.
2. Получены последовательности промоторов, кодирующих последовательностей и терминаторов для генов RsPXY, RsCRN и RsCLV2, причем промоторы RsCRN и RsCLV2 успешно амплифицированы с использованием праймеров для соответствующих последовательностей арабидопсис.
3. С использованием полученных последовательностей были получены репортерные конструкции с GUS и eGFP, а также соответствующие трансформанты для *E. coli* и *A. rhizogenes*.
4. Для ряда полученных конструкций получены трансгенные растения. Для растений, трансформированных AtCRN::AtCRN-eGFP и AtCLV2-eGFP, экспрессия трансгена продемонстрирована при помощи флуоресцентной микроскопии.
5. Оптимизация условий выращивания в закрытом грунте позволяет получать цветущие и образующие корнеплод растения вне привязки к естественному вегетационному периоду.

## Список литературы

1. Etchells J.P. et al A brief history of the TDIF-PXY signalling module: Balancing meristem identity and differentiation during vascular development // *New Phytol.* 2016. Т. 209. № 2. С. 474–484.
2. Somssich M. et al CLAVATA-WUSCHEL signaling in the shoot meristem // *Development.* 2016. Т. 143. № 18. С. 3238–3248.
3. Dodueva I.E. et al Plant stem cells: unity and diversity // *Vavilov J. Genet. Breed.* 2016. Т. 20. № 4. С. 441–458.
4. Coninck B. De, Smet I. De. Plant peptides - Taking them to the next level // *J. Exp. Bot.* 2016. Т. 67. № 16. С. 4791–4795.
5. Cho H. et al A secreted peptide acts on BIN2-mediated phosphorylation of ARFs to potentiate auxin response during lateral root development // *Nat. Cell Biol.* 2013. Т. 16. № 1. С. 66–76.
6. Etchells J.P., Turner S.R. The PXY-CLE41 receptor ligand pair defines a multifunctional pathway that controls the rate and orientation of vascular cell division // *Development.* 2010. Т. 137. № 5. С. 767–774.
7. Song S.-K., Lee M.M., Clark S.E. POL and PLL1 phosphatases are CLAVATA1 signaling intermediates required for Arabidopsis shoot and floral stem cells // *Development.* 2006. Т. 133. № 23. С. 4691–4698.
8. Hirakawa Y., Kondo Y., Fukuda H. TDIF Peptide Signaling Regulates Vascular Stem Cell Proliferation via the WOX4 Homeobox Gene in Arabidopsis // *Plant Cell.* 2010. Т. 22. № 8. С. 2618–2629.
9. Fisher K., Turner S. PXY, a Receptor-like Kinase Essential for Maintaining Polarity during Plant Vascular-Tissue Development // *Curr. Biol.* 2007. Т. 17. № 12. С. 1061–1066.
10. Etchells J.P., Provost C.M., Turner S.R. Plant Vascular Cell Division Is Maintained by an Interaction between PXY and Ethylene Signalling // *PLoS Genet.* 2012. Т. 8. № 11.
11. Додуева И.Е. et al CLE ПЕПТИДЫ – УНИВЕРСАЛЬНЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ РАЗВИТИЯ МЕРИСТЕМ // *Физиология растений.* 2012. Т. 59. № 1. С. 17–31.
12. Xu C. et al A cascade of arabinosyltransferases controls shoot meristem size in tomato // *Nat. Genet.* 2015. Т. 47. № 7. С. 784–792.
13. Shinohara H., Matsubayashi Y. Chemical synthesis of arabidopsis CLV3 glycopeptide reveals the impact of hydroxyproline arabinosylation on peptide conformation and activity // *Plant Cell Physiol.* 2013. Т. 54. № 3. С. 369–374.
14. Somssich M. et al Real-time dynamics of peptide ligand-dependent receptor complex

- formation in planta // *Sci. Signal.* 2015. T. 8. № 388. C. ra76-ra76.
15. Goad D.M., Zhu C., Kellogg E.A. Comprehensive identification and clustering of CLV3/ESR-related (CLE) genes in plants finds groups with potentially shared function // *New Phytol.* 2016. T. 2.
  16. Smakowska-Luzan E. et al An extracellular network of Arabidopsis leucine-rich repeat receptor kinases // *Nature.* 2018. T. 553. № 7688. C. 342–346.
  17. Ishida T. et al Heterotrimeric G proteins control stem cell proliferation through CLAVATA signaling in Arabidopsis. // *EMBO Rep.* 2014. T. 15. № 11. C. 1202–9.
  18. Kayes J.M., Clark S.E. *CLAVATA2*, a regulator of meristem and organ development in *Arabidopsis*. // *Development.* 1998. T. 125. № 19. C. 3843–3851.
  19. Shinohara H., Matsubayashi Y. Reevaluation of the CLV3-receptor interaction in the shoot apical meristem: Dissection of the CLV3 signaling pathway from a direct ligand-binding point of view // *Plant J.* 2015. T. 82. № 2. C. 328–336.
  20. Somssich M., Bleckmann A., Simon R. Shared and distinct functions of the pseudokinase CORYNE (CRN) in shoot and root stem cell maintenance of Arabidopsis // *J. Exp. Bot.* 2016. T. 67. № 16. C. 4901–4915.
  21. Shiu S.-H., Bleecker A.B. Receptor-like kinases from Arabidopsis form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2001. T. 98. № 19. C. 10763–10768.
  22. Whitford R. et al Plant CLE peptides from two distinct functional classes synergistically induce division of vascular cells // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2008. T. 105. № 47. C. 18625–18630.
  23. Gancheva M.S. et al Identification, expression, and functional analysis of CLE genes in radish (*Raphanus sativus* L.) storage root // *BMC Plant Biol.* 2016. T. 16. № S1. C. 7.
  24. Il'ina E.L. et al The effect of cytokinins on in vitro cultured inbred lines of *Raphanus sativus* var. radicula Pers. with genetically determined tumorigenesis // *Russ. J. Plant Physiol.* 2006. T. 53. № 4. C. 514–522.
  25. Doonan J.H., Sablowski R. Walls around tumours -why plants do not develop cancer // *Nat. Rev. Cancer.* 2010. T. 10. № 11. C. 794–802.
  26. Pan L. et al The Multifunction of CLAVATA2 in Plant Development and Immunity // *Front. Plant Sci.* 2016. T. 7. № October. C. 1573.
  27. Peláez P. et al Small RNAs Derived from the T-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* in Hairy Roots of *Phaseolus vulgaris* // *Front. Plant Sci.* 2017. T. 8. № February. C. 1–13.
  28. Gaillochet C., Daum G., Lohmann J.U. O Cell, Where Art Thou? The mechanisms of shoot meristem patterning // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2015. T. 23. C. 91–97.
  29. Sugimoto K., Jiao Y., Meyerowitz E.M. Arabidopsis regeneration from multiple tissues



- occurs via a root development pathway. // Dev. Cell. 2010. T. 18. № 3. C. 463–471.
30. Muller R., Bleckmann A., Simon R. The Receptor Kinase CORYNE of Arabidopsis Transmits the Stem Cell-Limiting Signal CLAVATA3 Independently of CLAVATA1 // Plant Cell Online. 2008. T. 20. № 4. C. 934–946.
  31. Wei Z. et al Identification and expression analysis of the LRR-RLK gene family in tomato (*Solanum lycopersicum*) Heinz 1706. // Genome. 2015. T. 58. № 4. C. 121–34.
  32. Nimchuk Z.L., Tarr P.T., Meyerowitz E.M. An Evolutionarily Conserved Pseudokinase Mediates Stem Cell Production in Plants // Plant Cell. 2011. T. 23. № 3. C. 851–854.
  33. Kucukoglu M., Nilsson O. CLE peptide signaling in plants - the power of moving around // Physiol. Plant. 2015. T. 155. № 1. C. 74–87.
  34. Iwase A. et al Report The AP2 / ERF Transcription Factor WIND1 Controls Cell Dedifferentiation in Arabidopsis // Curr. Biol. 2011. T. 21. № 6. C. 508–514.
  35. Ikeuchi M., Sugimoto K., Iwase A. Plant Callus: Mechanisms of Induction and Repression // Plant Cell. 2013. T. 25. № 9. C. 3159–3173.
  36. Dodueva I., Frolova N., Lutova L. Plant tumorigenesis: different ways for shifting systemic control of plant cell division and differentiation // Transgen. Plant J. 2007. T. 1. C. 17–38.
  37. Sun J. et al Genome-wide characterization, evolution, and expression analysis of the leucine-rich repeat receptor-like protein kinase (LRR-RLK) gene family in *Rosaceae* genomes // BMC Genomics. 2017. T. 18. № 1.
  38. Etchells J.P. et al WOX4 and WOX14 act downstream of the PXY receptor kinase to regulate plant vascular proliferation independently of any role in vascular organisation // Development. 2013. T. 140. № 10. C. 2224–2234.
  39. Suer S. et al WOX4 Imparts Auxin Responsiveness to Cambium Cells in Arabidopsis // Plant Cell Online. 2011. T. 23. № 9. C. 3247–3259.
  40. Ahmed M., Kim D.R. pcr: an R package for quality assessment, analysis and testing of qPCR data // PeerJ. 2018. T. 6. C. e4473.
  41. Ahuja M.R. Genetic tumors in *Nicotiana* and other plants // Q. Rev. Biol. 1998. T. 73. № 4. C. 439–462.
  42. Al-Shehbaz I.A., Beilstein M.A., Kellogg E.A. Systematics and phylogeny of the *Brassicaceae* (*Cruciferae*): An overview // Plant Systematics and Evolution. , 2006. C. 89–120.
  43. Ali M.A. et al Smart Parasitic Nematodes Use Multifaceted Strategies to Parasitize Plants // Front. Plant Sci. 2017. T. 8.
  44. Altschul S.F. et al Basic local alignment search tool. // J. Mol. Biol. 1990. T. 215. № 3. C. 403–10.
  45. Andrews S.J., Rothnagel J.A. Emerging evidence for functional peptides encoded by short

- open reading frames // *Nat. Rev. Genet.* 2014. T. 15. № 3. C. 193–204.
46. Arnim A.G. Von, Jia Q., Vaughn J.N. Regulation of plant translation by upstream open reading frames // *Plant Sci.* 2014. T. 214. C. 1–12.
  47. Ascencio-Ibanez J.T. et al Global Analysis of Arabidopsis Gene Expression Uncovers a Complex Array of Changes Impacting Pathogen Response and Cell Cycle during Geminivirus Infection // *PLANT Physiol.* 2008. T. 148. № 1. C. 436–454.
  48. Berardini T.Z. et al The arabidopsis information resource: Making and mining the «gold standard» annotated reference plant genome // *Genesis.* 2015. T. 53. № 8. C. 474–485.
  49. Berckmans B. et al Auxin-Dependent Cell Cycle Reactivation through Transcriptional Regulation of Arabidopsis E2Fa by Lateral Organ Boundary Proteins // *Plant Cell.* 2011. T. 23. № 10. C. 3671–3683.
  50. Betsuyaku S. et al Mitogen-activated protein kinase regulated by the CLAVATA receptors contributes to shoot apical meristem homeostasis // *Plant Cell Physiol.* 2011. T. 52. № 1. C. 14–29.
  51. Bhattacharjee S. et al IMPa-4, an Arabidopsis Importin Isoform, Is Preferentially Involved in Agrobacterium-Mediated Plant Transformation // *PLANT CELL ONLINE.* 2008. T. 20. № 10. C. 2661–2680.
  52. Bielach A., Hrtyan M., Tognetti V.B. Plants under stress: Involvement of auxin and cytokinin // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. T. 18. № 7.
  53. Bircheneder S., Dresselhaus T. Why cellular communication during plant reproduction is particularly mediated by CRP signalling // *J. Exp. Bot.* 2016. T. 67. № 16. C. 4849–4861.
  54. Bird D.M., Koltai H. Plant Parasitic Nematodes: Habitats, Hormones, and Horizontally-Acquired Genes. // *J. Plant Growth Regul.* 2000. T. 19. № 2. C. 183–194.
  55. Brencic A., Eberhard A., Winans S.C. Signal quenching, detoxification and mineralization of vir gene-inducing phenolics by the VirH2 protein of *Agrobacterium tumefaciens* // *Mol. Microbiol.* 2004. T. 51. № 4. C. 1103–1115.
  56. Buzovkina I.S., Lutova L.A. The genetic collection of radish inbred lines: history and prospects // *Genetika.* 2007. T. 43. № 10. C. 1411–1423.
  57. Cai X.T. et al Arabidopsis ERF109 mediates cross-talk between jasmonic acid and auxin biosynthesis during lateral root formation // *Nat. Commun.* 2014. T. 5.
  58. Cangelosi G.A., Ankenbauer R.G., Nester E.W. Sugars induce the *Agrobacterium* virulence genes through a periplasmic binding protein and a transmembrane signal protein. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1990. T. 87. № 17. C. 6708–6712.
  59. Casamitjana-Martínez E. et al Root-specific CLE19 overexpression and the *so11/2* suppressors implicate a CLV-like pathway in the control of Arabidopsis root meristem

- maintenance // Curr. Biol. 2003. T. 13. № 16. C. 1435–1441.
60. Chaturvedi P. Inhibitory response of *Raphanus sativus* on lipid peroxidation in albino rats // Evidence-based Complement. Altern. Med. 2008. T. 5. № 1. C. 55–59.
61. Chen M.-K. et al ERECTA Family Genes Regulate Auxin Transport in the Shoot Apical Meristem and Forming Leaf Primordia // PLANT Physiol. 2013. T. 162. № 4. C. 1978–1991.
62. Chinchilla D. et al A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence // Nature. 2007. T. 448. № 7152. C. 497–500.
63. Chung K.R., Tzeng D.D. Biosynthesis of Indole-3-Acetic Acid by the Gall-inducing Fungus *Ustilago esculenta* // J. Biol. Sci. 2004. T. 4. № 6. C. 744–750.
64. Cissé O.H. et al Genome sequencing of the plant pathogen *Taphrina deformans*, the causal agent of peach leaf curl // MBio. 2013. T. 4. № 3.
65. Clark S., Running M., Meyerowitz E. *CLAVATA3* is a specific regulator of shoot and floral meristem development affecting the same processes as *CLAVATA1* // Development. 1995. T. 121. C. 2057–2067.
66. Clark S.E., Running M.P., Meyerowitz E.M. *CLAVATA1*, a regulator of meristem and flower development in *Arabidopsis*. // Development. 1993. T. 119. № 2. C. 397–418.
67. Cock J.M., McCormick S. A Large Family of Genes That Share Homology with *CLAVATA3* // Plant Physiol. 2001. T. 126. № 3. C. 939–942.
68. Curtis I.S. The noble radish: Past, present and future // Trends Plant Sci. 2003. T. 8. № 7. C. 305–307.
69. Czyzewicz N. et al Message in a bottle: Small signalling peptide outputs during growth and development // J. Exp. Bot. 2013. T. 64. № 17. C. 5281–5296.
70. Daum G. et al A mechanistic framework for noncell autonomous stem cell induction in *Arabidopsis* // Proc. Natl. Acad. Sci. 2014. T. 111. № 40. C. 14619–14624.
71. Desvoves B. et al Cell Type-Specific Role of the Retinoblastoma / E2F Pathway during *Arabidopsis* Leaf Development 1 // Plant Physiol. 2005. T. 140. № January. C. 1–14.
72. Devos S. et al Infection of Chinese cabbage by *Plasmodiophora brassicae* leads to a stimulation of plant growth: Impacts on cell wall metabolism and hormone balance // New Phytol. 2005. T. 166. № 1. C. 241–250.
73. Doss R.P. et al Bruchins: Insect-derived plant regulators that stimulate neoplasm formation // Proc. Natl. Acad. Sci. 2000. T. 97. № 11. C. 6218–6223.
74. Duan M. et al Identification of Optimal Reference Genes for Expression Analysis in Radish (*Raphanus sativus* L.) and Its Relatives Based on Expression Stability // Front. Plant Sci. 2017. T. 8.
75. Durbak A.R., Tax F.E. *CLAVATA* signaling pathway receptors of *arabidopsis* regulate cell

- proliferation in fruit organ formation as well as in meristems // *Genetics*. 2011. T. 189. № 1. C. 177–194.
76. Faure J.D. et al The PASTICCINO genes of *Arabidopsis thaliana* are involved in the control of cell division and differentiation // *DEVELOPMENT*. 1998. T. 125. № 5. C. 909–918.
77. Fernando W.G.D. et al Molecular and morphological characteristics of *Apiosporina morbosa*, the causal agent of black knot in *Prunus* spp. // *Can. J. Plant Pathol.* 2005. T. 27. № 3. C. 364–375.
78. Fiers M. et al Mis-expression of the CLV3/ESR-like gene CLE19 in *Arabidopsis* leads to a consumption of root meristem // *Gene*. 2004. T. 327. № 1. C. 37–49.
79. Frank M. et al Hormone autotrophic growth and differentiation identifies mutant lines of *Arabidopsis* with altered cytokinin and auxin content or signaling. // *Plant Physiol.* 2000. T. 122. № 3. C. 721–9.
80. Frank M. et al Tumorous shoot development (*tsd*) genes are required for co-ordinated plant shoot development // *Plant J.* 2002. T. 29. № 1. C. 73–85.
81. Gifford M.L. The *Arabidopsis* ACR4 gene plays a role in cell layer organisation during ovule integument and sepal margin development // *Development*. 2003. T. 130. № 18. C. 4249–4258.
82. Goldraij A. et al Compartmentalization of S-RNase and HT-B degradation in self-incompatible *Nicotiana* // *Nature*. 2006. T. 439. № 7078. C. 805–810.
83. Gordon J.E., Christie P.J. The *Agrobacterium* Ti Plasmids // *Microbiol. Spectr.* 2014. T. 2. № 6.
84. Gorres K.L., Raines R.T. Prolyl 4-Hydroxylase. , 2010. 106-124 c.
85. Gou X. et al Genome-wide cloning and sequence analysis of leucine-rich repeat receptor-like protein kinase genes in *Arabidopsis thaliana* // *BMC Genomics*. 2010. T. 11. № 1. C. 19.
86. Gou X. et al Genetic evidence for an indispensable role of somatic embryogenesis receptor kinases in brassinosteroid signaling // *PLoS Genet.* 2012. T. 8. № 1.
87. Guo Y. et al CLAVATA2 forms a distinct CLE-binding receptor complex regulating *Arabidopsis* stem cell specification // *Plant J.* 2010. T. 63. № 6. C. 889–900.
88. Gutierrez C. DNA replication and cell cycle in plants: Learning from geminiviruses // *EMBO J.* 2000. T. 19. № 5. C. 792–799.
89. Gutiérrez R.M.P., Perez R.L. *Raphanus sativus* (Radish): Their Chemistry and Biology // *Sci. World J.* 2004. T. 4. C. 811–837.
90. Hanemian M. et al *Arabidopsis* CLAVATA1 and CLAVATA2 receptors contribute to *Ralstonia solanacearum* pathogenicity through a miR169-dependent pathway // *New Phytol.* 2016. T. 211. № 2. C. 502–515.
91. Hara K. et al The secretory peptide gene EPF1 enforces the stomatal one-cell-spacing rule //

- Genes Dev. 2007. T. 21. № 14. C. 1720–1725.
92. Hastwell A.H., Gresshoff P.M., Ferguson B.J. Genome-wide annotation and characterization of CLAVATA/ESR (CLE) peptide hormones of soybean (*Glycine max*) and common bean (*Phaseolus vulgaris*), and their orthologues of *Arabidopsis thaliana* // J. Exp. Bot. 2015. T. 66. № 17. C. 5271–5287.
  93. Hazak O. et al Perception of root-active CLE peptides requires CORYNE function in the phloem vasculature // EMBO Rep. 2017. T. 18. № 8. C. 1367–1381.
  94. Herrera-Estrella A. et al VirD proteins of *Agrobacterium tumefaciens* are required for the formation of a covalent DNA--protein complex at the 5' terminus of T-strand molecules // EMBO J. 1988. T. 7. № 13. C. 4055–4062.
  95. Hirakawa Y. et al Non-cell-autonomous control of vascular stem cell fate by a CLE peptide/receptor system // Proc. Natl. Acad. Sci. 2008. T. 105. № 39. C. 15208–15213.
  96. Hirakawa Y., Bowman J.L. A Role of TDIF Peptide Signaling in Vascular Cell Differentiation is Conserved Among Euphyllophytes // Front. Plant Sci. 2015. T. 6.
  97. Huang C.H. et al Resolution of brassicaceae phylogeny using nuclear genes uncovers nested radiations and supports convergent morphological evolution // Mol. Biol. Evol. 2016. T. 33. № 2. C. 394–412.
  98. Ilina E.L. et al. Lateral root initiation and formation within the parental root meristem of *Cucurbita pepo* : is auxin a key player ? // Ann. Bot. 2018. № April. C. 1–16.
  99. Initiative T.A.G. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana* // Nature. 2000. T. 408. № 6814. C. 796–815.
  100. Intrieri M.C., Buiatti M. The horizontal transfer of *Agrobacterium rhizogenes* genes and the evolution of the genus *Nicotiana* // Mol. Phylogenet. Evol. 2001. T. 20. № 1. C. 100–110.
  101. Ito Y. et al Dodeca-CLE as peptides as suppressors of plant stem cell differentiation // Science (80-. ). 2006. T. 313. № 5788. C. 842–845.
  102. Jang G. et al Cytokinin-dependent secondary growth determines root biomass in radish (*Raphanus sativus* L.). // J. Exp. Bot. 2015. T. 66. № 15. C. 4607–19.
  103. Jiang F. et al Involvement of Plant Stem Cells or Stem Cell-Like Cells in Dedifferentiation // Front. Plant Sci. 2015. T. 6.
  104. Johnson R. et al Detection and quantitation of octopine in normal plant tissue and in crown gall tumors // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1974. T. 71. № 2. C. 536–539.
  105. Katzen F. Gateway<sup>®</sup> recombinational cloning: a biological operating system // Expert Opin. Drug Discov. 2007. T. 2. № 4. C. 571–589.
  106. Kerr A. Transfer of virulence between isolates of *agrobacterium* // Nature. 1969. T. 223. № 5211. C. 1175–1176.

107. Kiba T. et al The type-A response regulator, ARR15, acts as a negative regulator in the cytokinin-mediated signal transduction in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Cell Physiol.* 2003. T. 44. № 8. C. 868–874.
108. Kim Y.S. et al CHRK1, a chitinase-related receptor-like kinase in tobacco. // *Plant Physiol.* 2000. T. 123. № 3. C. 905–915.
109. Kondo T. et al Dual assay for MCLV3 activity reveals structure-activity relationship of CLE peptides // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008. T. 377. № 1. C. 312–316.
110. Kondo Y. et al CLE peptides can negatively regulate protoxylem vessel formation via cytokinin signaling // *Plant Cell Physiol.* 2011. T. 52. № 1. C. 37–48.
111. Kondo Y. et al Plant GSK3 proteins regulate xylem cell differentiation downstream of TDIF-TDR signalling. // *Nat. Commun.* 2014. T. 5. C. 3504.
112. Kondo Y. et al A novel system for xylem cell differentiation in *arabidopsis thaliana* // *Mol. Plant.* 2015. T. 8. № 4. C. 612–621.
113. Kong Y. et al Tissue-specific expression of SMALL AUXIN UP RNA41 differentially regulates cell expansion and root meristem patterning in *arabidopsis* // *Plant Cell Physiol.* 2013. T. 54. № 4. C. 609–621.
114. Kosugi S., Ohashi Y. Constitutive E2F expression in tobacco plants exhibits altered cell cycle control and morphological change in a cell type-specific manner // *Plant Physiol.* 2003. T. 132. № 4. C. 2012–2022.
115. Krupková E. et al The Tumorous Shoot Development2 gene of *Arabidopsis* encoding a putative methyltransferase is required for cell adhesion and co-ordinated plant development // *Plant J.* 2007. T. 50. № 4. C. 735–750.
116. Krupková E., Schmülling T. Developmental consequences of the tumorous shoot development1 mutation, a novel allele of the cellulose-synthesizing KORRIGAN1 gene // *Plant Mol. Biol.* 2009. T. 71. № 6. C. 641–655.
117. Ku A.T. et al IbMADS1 (*Ipomoea batatas* MADS-box 1 gene) is involved in tuberous root initiation in sweet potato (*Ipomoea batatas*) // *Ann. Bot.* 2008. T. 102. № 1. C. 57–67.
118. Lammens T. et al Atypical E2Fs: new players in the E2F transcription factor family // *Trends Cell Biol.* 2009. T. 19. № 3. C. 111–118.
119. Latham J.R. et al Induction of plant cell division by beet curly top virus gene C4 // *Plant J.* 1997. T. 11. № 6. C. 1273–1283.
120. Lauressergues D. et al Primary transcripts of microRNAs encode regulatory peptides // *Nature.* 2015. T. 520. № 7545. C. 90–93.
121. Lebedeva Osipova M.A. et al Initiation of spontaneous tumors in radish (*Raphanus sativus*): Cellular, molecular and physiological events // *J. Plant Physiol.* 2015. T. 173. C. 97–104.

122. Lee J.H. et al CHRK1, a chitinase-related receptor-like kinase, plays a role in plant development and cytokinin homeostasis in tobacco // *Plant Mol. Biol.* 2003. T. 53. № 6. C. 877–890.
123. Leroux B. et al Characterization of the *virA* locus of *Agrobacterium tumefaciens*: a transcriptional regulator and host range determinant. // *EMBO J.* 1987. T. 6. № 4. C. 849–856.
124. Li Z. et al Two SERK Receptor-Like Kinases Interact with EMS1 to Control Anther Cell Fate Determination // *Plant Physiol.* 2017. T. 173. № 1. C. 326–337.
125. Liebsch D. et al Class I KNOX transcription factors promote differentiation of cambial derivatives into xylem fibers in the *Arabidopsis* hypocotyl // *Development.* 2014. T. 141. № 22. C. 4311–4319.
126. Liu P.-L. et al Origin and diversification of leucine-rich repeat receptor-like protein kinase (LRR-RLK) genes in plants // *BMC Evol. Biol.* 2017. T. 17. № 1. C. 47.
127. Loomis R.S., Torrey J.G. Chemical Control of Vascular Cambium Initiation in Isolated Radish Roots. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1964. T. 52. № 1. C. 3–11.
128. Malinowski R. et al The role of cytokinins in clubroot disease // *Eur. J. Plant Pathol.* 2016. T. 145. № 3. C. 543–557.
129. Mandel T. et al Differential regulation of meristem size, morphology and organization by the *ERECTA*, *CLAVATA* and class III HD-ZIP pathways // *Development.* 2016. T. 143. № 9. C. 1612–1622.
130. Mapes C.C., Davies P.J. Cytokinins in the ball gall of *Solidago altissima* and in the gall forming larvae of *Eurosta solidaginis* // *New Phytologist.* , 2001. C. 203–212.
131. Maróti G., Downie J.A., Kondorosi É. Plant cysteine-rich peptides that inhibit pathogen growth and control rhizobial differentiation in legume nodules // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2015. T. 26. C. 57–63.
132. Marshall E., Costa L.M., Gutierrez-Marcos J. Cysteine-Rich Peptides (CRPs) mediate diverse aspects of cell-cell communication in plant reproduction and development // *J. Exp. Bot.* 2011. T. 62. № 5. C. 1677–1686.
133. Matsubayashi Y. Posttranslationally Modified Small-Peptide Signals in Plants // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2014. T. 65. № 1.
134. Matveeva T. V. et al Hormonal control of tumor formation in radish // *J. Plant Growth Regul.* 2004. T. 23. № 1. C. 37–43.
135. Matveeva T. V., Lutova L.A. Horizontal gene transfer from *Agrobacterium* to plants // *Front. Plant Sci.* 2014. T. 5.
136. McDermott J., Meilan R., Thornburg R. Plant-insect interactions: The hackberry nipple gall // *World Wide Web J. Biol.* 1996. T. 2. C. 32–38.

137. Melchers L.S. et al Specificity of signal molecules in the activation of *Agrobacterium* virulence gene expression // Mol. Microbiol. 1989. T. 3. № 7. C. 969–977.
138. Melis R.J.M., Staden J. van. Tuberization in Cassava (*Manihot esculenta*): Cytokinin and Absciscic Acid Activity in Tuberous Roots // J. Plant Physiol. 1985. T. 118. № 4. C. 357–366.
139. Melzer S. et al Flowering-time genes modulate meristem determinacy and growth form in *Arabidopsis thaliana* // Nat. Genet. 2008. T. 40. № 12. C. 1489–1492.
140. Miwa H. et al The receptor-like kinase SOL2 mediates CLE signaling in *Arabidopsis* // Plant Cell Physiol. 2008. T. 49. № 11. C. 1752–1757.
141. Moghe G.D. et al Consequences of Whole-Genome Triplication as Revealed by Comparative Genomic Analyses of the Wild Radish *Raphanus raphanistrum* and Three Other Brassicaceae Species // Plant Cell. 2014. T. 26. № 5. C. 1925–1937.
142. Mortier V. et al Search for nodulation-related CLE genes in the genome of *Glycine max* // J. Exp. Bot. 2011. T. 62. № 8. C. 2571–2583.
143. Mun J.H. et al Construction of a reference genetic map of *Raphanus sativus* based on genotyping by whole-genome resequencing // Theor. Appl. Genet. 2014. T. 128. № 2. C. 259–272.
144. Murashige T., Skoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures // Physiol. Plant. 1962. T. 15. № 3. C. 473–497.
145. Nester E.W. *Agrobacterium*: nature's genetic engineer // Front. Plant Sci. 2015. T. 5.
146. Nobusawa T. et al Synthesis of Very-Long-Chain Fatty Acids in the Epidermis Controls Plant Organ Growth by Restricting Cell Proliferation // PLoS Biol. 2013. T. 11. № 4.
147. Oelkers K. et al Bioinformatic analysis of the CLE signaling peptide family // BMC Plant Biol. 2008. T. 8.
148. Ogawa-Ohnishi M., Matsubayashi Y. Identification of three potent hydroxyproline O-galactosyltransferases in *Arabidopsis* // Plant J. 2015. T. 81. № 5. C. 736–746.
149. Ohashi-Ito K., Oda Y., Fukuda H. *Arabidopsis* VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN6 Directly Regulates the Genes That Govern Programmed Cell Death and Secondary Wall Formation during Xylem Differentiation // Plant Cell. 2010. T. 22. № 10. C. 3461–3473.
150. Okonechnikov K. et al Unipro UGENE: A unified bioinformatics toolkit // Bioinformatics. 2012. T. 28. № 8. C. 1166–1167.
151. Okushima Y. et al ARF7 and ARF19 Regulate Lateral Root Formation via Direct Activation of LBD/ASL Genes in *Arabidopsis* // PLANT CELL ONLINE. 2007. T. 19. № 1. C. 118–130.
152. Osipova M.A. et al WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN5 Gene Expression and Interaction of CLE Peptides with Components of the Systemic Control Add Two Pieces to the Puzzle of Autoregulation of Nodulation // Plant Physiol. 2012. T. 158. № 3. C. 1329–1341.



153. Pan S.Q. et al Preformed dimeric state of the sensor protein VirA is involved in plant--  
Agrobacterium signal transduction. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1993. T. 90. № 21. C.  
9939–43.
154. Park J. et al Altered cell shapes, hyperplasia, and secondary growth in Arabidopsis caused  
by beet curly top geminivirus infection. // Mol. Cells. 2004. T. 17. № 1. C. 117–24.
155. Pauwels L. et al Mapping methyl jasmonate-mediated transcriptional reprogramming of  
metabolism and cell cycle progression in cultured Arabidopsis cells // Proc. Natl. Acad. Sci.  
2008. T. 105. № 4. C. 1380–1385.
156. Pearce G. et al Structure-activity studies of GmSubPep, a soybean peptide defense signal  
derived from an extracellular protease // Peptides. 2010. T. 31. № 12. C. 2159–2164.
157. Perilli S., Mambro R. Di, Sabatini S. Growth and development of the root apical meristem //  
Curr. Opin. Plant Biol. 2012. T. 15. № 1. C. 17–23.
158. Perley J.E., Stowe B.B. On the ability of *Taphrina deformans* to produce indoleacetic acid  
from tryptophan by way of tryptamine. // Plant Physiol. 1966. T. 41. № 2. C. 234–7.
159. Persinger S.M., Christopher D.T. Isolation and characterization of hormone-autonomous  
tumours of Arabidopsis thaliana // J. Exp. Bot. 1991. T. 42. № 11. C. 1363–1370.
160. Pfaffl M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT – PCR //  
2001. T. 29. № 9. C. 16–21.
161. Pinto U.M., Pappas K.M., Winans S.C. The ABCs of plasmid replication and segregation //  
Nat. Rev. Microbiol. 2012. T. 10. № 11. C. 755–765.
162. Qiang Y. et al CLE Peptides in Vascular Development // J. Integr. Plant Biol. 2013. T. 55. №  
4. C. 389–394.
163. Qu L.J. et al Peptide signalling during the pollen tube journey and double fertilization // J.  
Exp. Bot. 2015. T. 66. № 17. C. 5139–5150.
164. Rasch E., Swift H., Klein R.M. Nucleoprotein Changes in Plant Tumor Growth // J.  
Biophys. Biochem. Cytol. 1959. T. 6. № 1. C. 11–34.
165. Replogle A. et al Nematode CLE signaling in Arabidopsis requires CLAVATA2 and  
CORYNE // Plant J. 2011. T. 65. № 3. C. 430–440.
166. Ron M. et al Hairy Root Transformation Using *Agrobacterium rhizogenes* as a Tool for  
Exploring Cell Type-Specific Gene Expression and Function Using Tomato as a Model //  
PLANT Physiol. 2014. T. 166. № 2. C. 455–469.
167. Roudier F. et al Very-Long-Chain Fatty Acids Are Involved in Polar Auxin Transport and  
Developmental Patterning in Arabidopsis // Plant Cell. 2010. T. 22. № 2. C. 364–375.
168. Sablowski R.W.M., Meyerowitz E.M. A homolog of NO APICAL MERISTEM is an  
immediate target of the floral homeotic genes APETALA3/PISTILLATA // Cell. 1998. T. 92. №

1. C. 93–103.
169. Sallaud C. et al High throughput T-DNA insertion mutagenesis in rice: A first step towards in silico reverse genetics // *Plant J.* 2004. T. 39. № 3. C. 450–464.
170. Schneeberger R.G. et al *Agrobacterium* T-DNA integration in *Arabidopsis* is correlated with DNA sequence compositions that occur frequently in gene promoter regions // *Funct. Integr. Genomics.* 2005. T. 5. № 4. C. 240–253.
171. Schoof H. et al The stem cell population of *Arabidopsis* shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the *CLAVATA* and *WUSCHEL* genes // *Cell.* 2000. T. 100. № 6. C. 635–644.
172. Schuller A., Kehr J., Ludwig-Müller J. Laser microdissection coupled to transcriptional profiling of *Arabidopsis* roots inoculated by *Plasmodiophora brassicae* indicates a role for brassinosteroids in clubroot formation // *Plant Cell Physiol.* 2014. T. 55. № 2. C. 392–411.
173. Schwelm A. et al Not in your usual Top 10: protists that infect plants and algae // *Mol. Plant Pathol.* 2018. T. 19. № 4. C. 1029–1044.
174. Seitz E.W., Hochster R.M. Free proline in normal and in crown-gall tumor tissue of tomato and tobacco // *Life Sci.* 1964. T. 3. № 9. C. 1033–1037.
175. Sen P. et al Cooperative binding of *Agrobacterium tumefaciens* VirE2 protein to single-stranded DNA. // *J. Bacteriol.* 1989. T. 171. № 5. C. 2573–2580.
176. Sieberer T. et al *PROPORZ1*, a putative *Arabidopsis* transcriptional adaptor protein, mediates auxin and cytokinin signals in the control of cell proliferation // *Curr. Biol.* 2003. T. 13. № 10. C. 837–842.
177. Smith E.F., Townsend C.O. A Plant-Tumor of Bacterial Origin // *Science* (80-. ). 1907. T. 25. № 643. C. 671–673.
178. Smith H.H. The inheritance of genetic tumors in *Nicotiana* hybrids // *J. Hered.* 1988. T. 79. № 4. C. 277–283.
179. Song W. et al Signature motif-guided identification of receptors for peptide hormones essential for root meristem growth // *Cell Res.* 2016. T. 26. № 6. C. 674–685.
180. Song W. et al Structural insights into ligand recognition and activation of plant receptor kinases // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2017. T. 43. C. 18–27.
181. Stahl Y. et al A Signaling Module Controlling the Stem Cell Niche in *Arabidopsis* Root Meristems // *Curr. Biol.* 2009. T. 19. № 11. C. 909–914.
182. Stahl Y. et al Moderation of *Arabidopsis* root stemness by *CLAVATA1* and *ARABIDOPSIS CRINKLY4* receptor kinase complexes // *Curr. Biol.* 2013. T. 23. № 5. C. 362–371.
183. Steeves T.A., Sussex I.M. *Patterns in Plant Development.* , 1989. 388 c.
184. Stieger P.A. et al The *orf13* T-DNA Gene of *Agrobacterium rhizogenes* Confers

- Meristematic Competence to Differentiated Cells // Plant Physiol. 2004. T. 135. № 3. C. 1798–1808.
185. Sugano S.S. et al Stomagen positively regulates stomatal density in Arabidopsis // Nature. 2010. T. 463. № 7278. C. 241–244.
186. Sun Y. et al Genome-wide identification of microRNAs associated with taproot development in radish (*Raphanus sativus* L.) // Gene. 2015. T. 569. № 1. C. 118–126.
187. Tabata S., Hooykaas P.J., Oka A. Sequence determination and characterization of the replicator region in the tumor-inducing plasmid pTiB6S3. // J. Bacteriol. 1989. T. 171. № 3. C. 1665–1672.
188. Tavares S. et al Direct detection of *Taphrina deformans* on peach trees using molecular methods // Eur. J. Plant Pathol. 2004. T. 110. № 10. C. 973–982.
189. Tavormina P. et al The Plant Peptidome: An Expanding Repertoire of Structural Features and Biological Functions // Plant Cell. 2015. T. 27. № 8. C. 2095–2118.
190. Ting F., Wren M. Storage Organ Development in Radish (*Raphanus sativus* L.). 1. A Comparison of Development in Seedlings and Rooted Cuttings of Two Contrasting Varieties // Ann. Bot. 1980. T. 46. № 1964. C. 267–276.
191. Toro N. et al Role of the overdrive sequence in T-DNA border cleavage in *Agrobacterium* // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1988. T. 85. № 22. C. 8558–8562.
192. Toro N. et al The *Agrobacterium tumefaciens* virC1 gene product binds to overdrive, a T-DNA transfer enhancer // J. Bacteriol. 1989. T. 171. № 12. C. 6845–6849.
193. Tsuru M. et al Mapping of QTLs controlling root shape and red pigmentation in radish , // Breed. Sci. 2008. T. 61. C. 55–61.
194. Untergasser A. et al Primer3-new capabilities and interfaces // Nucleic Acids Res. 2012. T. 40. № 15.
195. Vanessa E. Wall , Leslie A. Garvey , Jennifer L. Mehalko , Lauren V. Procter and D.E. Combinatorial Assembly of Clone Libraries Using Site-Specific Recombination. , 2014. 193-208 c.
196. Vanholme B. et al Secretions of plant-parasitic nematodes: A molecular update // Gene. 2004. T. 332. № 1–2. C. 13–27.
197. Wang S. et al Transcriptome analysis of the roots at early and late seedling stages using Illumina paired-end sequencing and development of EST-SSR markers in radish // Plant Cell Rep. 2012. T. 31. № 8. C. 1437–1447.
198. Wang X. et al A parasitism gene from a plant-parasitic nematode with function similar to CLAVATA3/ESR (CLE) of *Arabidopsis thaliana* // Mol. Plant Pathol. 2005. T. 6. № 2. C. 187–191.

199. Yadav R.K. et al WUSCHEL protein movement mediates stem cell homeostasis in the *Arabidopsis* shoot apex // *Genes Dev.* 2011. T. 25. № 19. C. 2025–2030.
200. Yaginuma H. et al A novel function of TDIF-related peptides: Promotion of axillary bud formation // *Plant Cell Physiol.* 2011. T. 52. № 8. C. 1354–1364.
201. Yamamoto R. et al Brassinosteroid levels increase drastically prior to morphogenesis of tracheary elements. // *Plant Physiol.* 2001. T. 125. № 2. C. 556–63.
202. Yamamoto R. et al Co-regulation of brassinosteroid biosynthesis-related genes during xylem cell differentiation // *Plant Cell Physiol.* 2007. T. 48. № 1. C. 74–83.
203. Yao Y. et al The effects of calcium on the in vitro cassava storage root formation // *Adv. Mater. Res.* 2013. T. 726–731. C. 4529–4533.
204. You M.K. et al Identification of genes possibly related to storage root induction in sweetpotato // *FEBS Lett.* 2003. T. 536. № 1–3. C. 101–105.
205. Young J.M. et al Classification and nomenclature of *Agrobacterium* and *Rhizobium* - A reply to Farrand et al. (2003) // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2003. T. 53. № 5. C. 1689–1695.
206. Yu R. et al Transcriptome Profiling of Taproot Reveals Complex Regulatory Networks during Taproot Thickening in Radish (*Raphanus sativus* L.) // *Front. Plant Sci.* 2016. T. 7. № August. C. 1–17.
207. Zaenen I. et al Supercoiled circular DNA in crown-gall inducing *Agrobacterium* strains // *J. Mol. Biol.* 1974. T. 86. № 1.
208. Zhang H. et al Crystal structure of PXY-TDIF complex reveals a conserved recognition mechanism among CLE peptide-receptor pairs // *Cell Res.* 2016a. T. 26. № 5. C. 543–555.
209. Zhang H. et al SERK Family Receptor-like Kinases Function as Co-receptors with PXY for Plant Vascular Development // *Mol. Plant.* 2016b. T. 9. № 10. C. 1406–1414.
210. Zhao Z. et al Activities of virE1 and the VirE1 secretion chaperone in export of the multifunctional VirE2 effector via an *Agrobacterium* type IV secretion pathway // *J. Bacteriol.* 2001. T. 183. № 13. C. 3855–3865.
211. Zhong R. et al Transcriptional activation of secondary wall biosynthesis by rice and maize NAC and MYB transcription factors // *Plant Cell Physiol.* 2011. T. 52. № 10. C. 1856–1871.
212. Zhong R., Richardson E.A., Ye Z.-H. The MYB46 Transcription Factor Is a Direct Target of SND1 and Regulates Secondary Wall Biosynthesis in *Arabidopsis* // *PLANT CELL ONLINE.* 2007. T. 19. № 9. C. 2776–2792.
213. Zhou Y. et al Control of plant stem cell function by conserved interacting transcriptional regulators // *Nature.* 2015. T. 517. № 7534. C. 377–380.
214. Zhu J. et al The bases of crown gall tumorigenesis // *J. Bacteriol.* 2000. T. 182. № 14. C. 3885–3895.

215. Zulawski M., Braginets R., Schulze W.X. PhosPhAt goes kinases-searchable protein kinase target information in the plant phosphorylation site database PhosPhAt // *Nucleic Acids Res.* 2013. Т. 41. № D1.
216. Додуева И. Е., Кирюшкин А. С., Юрлова Е. В., Осипова М. А., Бузовкина И. С. Л.Л.А. ВЛИЯНИЕ ЦИТОКИНИНОВ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ СЛЕ РЕДИСА // *Физиология Растений.* 2013. Т. 60. № 3. С. 399–407.

## Приложение 1: Используемые праймеры

Праймер	Последовательность
Для создания трехкомпонентных векторов	
F_RsPXYcds_attB1_1	5'-GGGGACAAC TTT GTACAAA AAAGTTGGC-ATGAACAAGAAGAACAAC TTTCTCTTTC-3'
F_RsPXYcds_attB1_2	5'-GGGGACAAC TTT GTACAAA AAAGTTGGCATGAACAAGAAGAACAAC TTTCTCTTTC-3'
F_RsPXYpro_attB4_1	5'-GGGGACAAC TTT GTATAGA AAAGTTGGC-GACCATTGATCCGGTCCTAA-3'
R_RsPXYpro_attB1	5'-GGGGCCAAC TTT TTTGTAC AAAGTTGGCTTTT TAGGAAGAAGAAAGTG-3'
F_RsPXYter_attB2	5'-GGGGCCAAC TTT CTGTAC AAAGTTGGTTTGTGATATATCTTTTGTATTTGGTG-3'
R_RsPXYter_attB3	5'-GGGGACAAC TTT GTATAAT AAAGTTGGC-GACTTCCTCACTTTCTGCAGC-3'
Для ОТ-ПЦР	
UBC_F	5'- ACTTGGTCCTCAGGCTTCGTGGT-3'
UBC_R	5'-AAAGATCAACCTCTGCTGGTCCG-3'
F_CLV2	5'-TTGCCTTCTTGTTTGGGTTC-3'
R_CLV2	5'-CTCGGTGATCCTCAAGGGTA-3'
F_CRN	5'-CCTGTGGTGTTCTCCCTAA-3'
R_CRN	5'- TTGCTTGTTGTTGCTTCTGG-3'
Для создания двухкомпонентных векторов	
F_RsCLV2pro_attB1	5'-GGGGACAAC TTTGTACAAAAAAGTTGGCGTCAGATATGCATGATGGACAAA-3'
R_RsCLV2pro_attB2	5'-GGGGACAAC TTTGTACAAGAAAGTTGGAGCTCAGAGGAGAAAGATGAAGTT -3'
F_RsCRNpro_attB1	5'-GGGGACAAC TTTGTACAAAAAAGTTGGCCTTTCGAGGCATTCTCTCGTT -3'
R_RsCRNpro_attB2	5'-GGGGACAAC TTTGTACAAGAAAGTTGGTGCTGCTTCTACGAATAAAAGTT -3'

## Приложение 2: Протоколы ПЦР

RsPXYpro attB1,2:

- 1 цикл – 98<sup>0</sup>C, 2 мин
- 5 циклов – 98<sup>0</sup>C, 20 с; 58<sup>0</sup>C, 20 с; 72<sup>0</sup>C, 2 мин
- 30 циклов - 98<sup>0</sup>C, 20 с; 65<sup>0</sup>C, 20 с; 72<sup>0</sup>C, 2 мин
- 1 цикл - 72<sup>0</sup>C, 5 мин

RsCRNpro attB1,2:

- 1 цикл – 98<sup>0</sup>C, 2 мин
- 5 циклов – 98<sup>0</sup>C, 20 с; 58<sup>0</sup>C, 20 с; 72<sup>0</sup>C, 2 мин
- 30 циклов - 98<sup>0</sup>C, 20 с; 65<sup>0</sup>C, 20 с; 72<sup>0</sup>C, 2 мин
- 1 цикл - 72<sup>0</sup>C, 5 мин

RsCLV2pro attB1,2:

- 1 цикл – 98<sup>0</sup>C, 2 мин
- 5 циклов – 98<sup>0</sup>C, 20 с; 58<sup>0</sup>C, 20 с; 72<sup>0</sup>C, 2 мин
- 30 циклов - 98<sup>0</sup>C, 20 с; 65<sup>0</sup>C, 20 с; 72<sup>0</sup>C, 2 мин
- 1 цикл - 72<sup>0</sup>C, 5 мин

RsPXYpro attB4,1

- 1 цикл – 98<sup>0</sup>C, 2 мин
- 5 циклов – 98<sup>0</sup>C, 20 с; 58 - 60<sup>0</sup>C, 20 с; 72<sup>0</sup>C, 2 мин

- 30 циклов - 98<sup>0</sup>C, 20 с; 65<sup>0</sup>C, 20 с; 72<sup>0</sup>C, 2 мин
- 1 цикл - 72<sup>0</sup>C, 5 мин

#### RsPXYpro attB4,1

- 1 цикл – 98<sup>0</sup>C, 2 мин
- 5 циклов – 98<sup>0</sup>C, 20 с; 58 - 60<sup>0</sup>C, 20 с; 72<sup>0</sup>C, 2 мин
- 30 циклов - 98<sup>0</sup>C, 20 с; 65<sup>0</sup>C, 20 с; 72<sup>0</sup>C, 2 мин
- 1 цикл - 72<sup>0</sup>C, 5 мин

#### RsPXYcds attB1-eGFP

- 1 цикл – 98<sup>0</sup>C, 2 мин
- 5 циклов – 98<sup>0</sup>C, 20 с; 58 - 60<sup>0</sup>C, 20 с; 72<sup>0</sup>C, 2 мин
- 30 циклов - 98<sup>0</sup>C, 20 с; 65<sup>0</sup>C, 20 с; 72<sup>0</sup>C, 2 мин
- 1 цикл - 72<sup>0</sup>C, 5 мин

#### RsPXYcds-eGFP attB1,2 overlap PCR

- 1 цикл – 98<sup>0</sup>C, 2 мин
- 35 циклов - 98<sup>0</sup>C, 20 с; 72<sup>0</sup>C, 3 мин
- 1 цикл - 72<sup>0</sup>C, 5 мин

#### Протокол для Taq-полимеразы и проверки наличия вставки:

- 1 цикл – 95<sup>0</sup>C , 2 мин
- 35 циклов - 95<sup>0</sup>C, 20 с; 58<sup>0</sup>C, 20 с; 72<sup>0</sup>C, 2 мин 20 с
- 1 цикл - 72<sup>0</sup>C, 5 мин



### Приложение 3: Полученные векторы

Название вектора	Исходный вектор	Вставка/Компоненты вектора	Маркер устойчивости после рекомбинации	Трансформация <i>E. coli</i>	Трансформация <i>A. rhizogenes</i>
pENTR2.2.1: RsCRNpro	pDONR2.2.1	RsCRNpro attB1,2*	Km	+	-
pENTR2.1.1: RsCLV2pro	pDONR2.2.1	RsCLV2pro attB1,2	Km	+	-
pENTR2.1.1: RsPXYpro	pDONR2.2.1	RsPXYpro attB1,2	Km	+	-
RsCRN::GUS	pBGWGS7.0	pENTR2.2.1: RsCRNpro	Sp	+	+
RsCLV2::GUS	pBGWGS7.0	pENTR2.2.1: RsCLV2pro	Sp	+	+
RsPXY::GUS	pBGWGS7.0	pENTR2.2.1: RsCLV2pro	Sp	+	+
pENTR2.1.1: AtCRN-eGFP**	pDONR2.2.1	RsCRN-eGFP attB1,2	Km	+	-
pENTR4.1: AtCRNpro**	pDONR4.1	RsCRNpro attB4,1	Km	+	-
pENTR2.3: AtCRNter**	pDONR2.3	RsCRNter attB2,3	Km	+	-
AtCRN::AtCRN-eGFP	pKm4.3GW	pENTR2.1.1: RsCRN-eGFP + pENTR4.1: RsCRNpro + pENTR2.3: RsCRNter	Sp	+	+

pENTR2.1.1: AtCLV2- eGFP**	pDONR2.2.1	RsCLV2-eGFP attB1,2	Km	+	-
pENTR4.1: AtCLV2pro**	pDONR4.1	RsCLV2pro attB4,1	Km	+	-
pENTR2.3: AtCLV2ter**	pDONR2.3	RsCRNter attB2,3	Km	+	-
AtCRN:: AtCLV2-eGFP	pKm4.3GW	pENTR2.1.1: RsCLV2-eGFP + pENTR4.1: RsCLV2pro + pENTR2.3: RsCLV2ter	Sp	+	+
pENTR2.1.1: RsPXY-eGFP	pDONR2.2.1	RsPXY-eGFP attB1,2	Km	+	-
pENTR4.1: RsPXYpro	pDONR4.1	RsPXYpro attB4,1	Km	+	-
pENTR2.3: RsPXYter	pDONR2.3	RsCRNter attB2,3	Km	+	-
RsPXY:: RsPXY-eGFP	pKm4.3GW	pENTR2.1.1: RsPXY-eGFP + pENTR4.1: RsPXYpro + pENTR2.3: RsPXYter	Sp	+	+

\*Нотация адаптеров для GateWay™ дана в соответствии с [Wall *et al*, 2014] \*\* Любезно предоставлены А.А. Ткаченко (СПбГУ, лаборатория геномной и клеточной инженерии растений)